

BIANCA ALCÂNTARA DA SILVA

**Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre
aspectos múltiplos da bioquímica e biologia celular
do fungo *Pseudallescheria boydii***



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientadores: Prof. André Luis Souza dos Santos
Profa. Eliana Barreto-Bergter

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
JULHO DE 2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, Bianca Alcântara da

Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre aspectos múltiplos da bioquímica e biologia celular do fungo *Pseudallescheria boydii* / Bianca Alcântara da Silva - Rio de Janeiro, Julho de 2009.

XVII, 137p.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Pulo de Góes, 2009.

Orientadores: Prof. André Luis Souza dos Santos e Profa. Eliana Barreto-Bergter.

Referências Bibliográficas: f117-135

1. *Pseudallescheria boydii* 2. Peptidase 3. Inibidores proteolíticos 4. Proteômica

I. Santos, André II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes

III. Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre aspectos múltiplos da bioquímica e biologia celular do fungo *Pseudallescheria boydii*

Bianca Alcântara da Silva

Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre aspectos múltiplos da bioquímica e biologia celular do fungo *Pseudallescheria boydii*

Rio de Janeiro, 31 de Julho de 2009

André Luis Souza dos Santos, Doutor, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes - UFRJ

Eliana Barreto-Bergter, Doutora, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes - UFRJ

Marcio Lourenço Rodrigues, Doutor, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes - UFRJ

Daniela Sales Alviano, Doutora, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes - UFRJ

Carlos Taborda, Doutor, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, USP

Dario Kalume, Doutor, Departamento de Medicina Tropical, FIOCRUZ

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a orientação dos Profs. André Luis Souza dos Santos e Eliana Barreto-Bergter.

“Mas aqueles que contam com o Senhor renovam suas forças; Ele dá-lhes asas de águia. Correm sem se cansar, vão em frente sem se fatigar.”

(Is 40: 31)

A meus pais, João Fernandes e Maria José, que sempre estiveram ao meu lado e nunca mediram esforços para que eu conquistasse mais esse objetivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, Deus Filho e Deus Espírito Santo, fonte de vida e luz, por seu amor incondicional e amparo em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos. Eu não conseguiria expressar com palavras a profunda admiração e o amor que eu sinto por ti. Muito do que eu sou hoje como profissional eu devo a você. Seu apoio, amizade e até mesmo os “puxões de orelha” me fizeram amadurecer muito nesse período em que trabalhamos juntos. São poucas as pessoas que, como você dedicam tanto amor pelo que fazem que acabam por contagiar quem está a sua volta. Você com toda sua competência é um exemplo a ser seguido. O meu muito obrigada pelos seus ensinamentos, paciência, ajuda profissional, pela sua alegria diária e pela sua amizade.

A minha orientadora Profa. Eliana Barreto-Bergter pelo carinho, por ter acreditado neste trabalho desde o início, me dando à chance de trabalhar com esse microrganismo e deixando sempre de portas abertas o seu laboratório para realização deste trabalho. Expresso minha mais profunda gratidão e admiração.

Ao Prof. Márcio Rodrigues pela revisão e valiosas sugestões no texto desta tese e pela agradável convivência diária.

A Profa. Daniela Sales Alviano pelas portas sempre abertas do seu laboratório e pela participação na avaliação desta tese.

Ao Dr. Dário Kalume pela ajuda essencial nas análises por espectrometria de massa e pela participação na avaliação desta tese.

Ao Prof. Carlos Taborda pela participação na avaliação desta tese.

A Profa. Marta Branquinha por sua amizade, por sempre estar disposta a ouvir as minhas lamentações e sempre rebater com uma palavra de incentivo. E também pelos múltiplos empréstimos (cubas, reagentes, soluções, ...).

Ao Prof. Leonardo Nimrichter por toda ajuda nos experimentos de esterol e pelas risadas diárias.

A Profa. Rosangela Soares pelas portas abertas de seu laboratório e por ter acreditado em mim no início desta jornada.

A Profa. Maria Teresa Romanos pelo seu carinho e pela ajuda nos ensaios com células hospedeiras.

Ao Prof. Alexandre Pirro pelo auxílio nos experimentos de toxicidade *in vivo*.

A Dra. Cátia Sodré por toda parte de proteômica.

A Dra Marcia Pinto pelo carinho e por ter me iniciado nos trabalho com *P. boydii*. Expresso minha profunda gratidão e admiração.

A Profa. Celuta Alviano pelas portas sempre abertas de seu laboratório e a seu grupo de trabalho: Vanila, Cátia, Gleiser, Fatinha, Cristina, Luiz e Davi.

A Profa. Angela Hampshire pelas portas sempre abertas de seu laboratório e ao seu grupo: Daniele, Marta, Cirilo, Fernando, Luciana e Felipe.

A Geralda por todo suporte técnico, pela agradável convivência e pelas risadas diárias.

Aos meus amigos e companheiros de bancada. Obrigada pelas boas risadas de todos os dias e por me fazer sentir alegria em trabalhar em um lugar onde me sinto bem. Carina, Roberta, Anderson, Fernanda, Lys e Polli. E especialmente a Ana Luiza, Ana Carolina, Érika e Viviane pelas essenciais ajudas experimentais.

As minhas amigas de bancada e confidentes Fernanda e Camila que desde o início sempre estiveram ao meu lado. Meu muito obrigada pelo incentivo e pelas conversas sempre agradáveis e divertidas.

Aos grupos dos Profs. Márcio e Leonardo: Fabiane, Fernanda, Débora, Mari, Pati, Pri, Ju, Luna, Gabi, Deborah e Carol. Obrigada pela agradável convivência e risadas de todos os dias.

Ao Grupo da Profa. Marta Branquinha pela agradável convivência e pelos constantes empréstimos: Fernanda, Michel, Keila, Leandro e Pedro.

Ao Grupo da Profa. Eliana pela agradável convivência e pelos constantes empréstimos, principalmente de *P. boydii*: Vera Carolina, Livia, Renata, Fatinha, Rodrigo, Bianca e Magda.

A minha amiga Claudinha d'Avila Levy por todo incentivo e por sua amizade.

As minhas amigas, que me "aturam" desde a graduação Lys e Celina. Obrigada pela amizade, pelo carinho e pelas risadas descontraídas de todos os dias. Amo vocês!

A minha prima-irmã Fernanda meu muito obrigada pelas palavras de incentivo por sempre estar ao meu lado e pelas suas orações.

A toda minha família e meus amigos, em especial a meus avós Elidio e Aparecida, pelo apoio e por sempre estarem ao meu lado nos momentos bons ou ruins.

Especialmente eu agradeço aos meus pais, João e Zezé. A vocês que me ensinaram a viver a vida com dignidade. Que muitas vezes renunciaram aos seus sonhos, para que pudessem realizar os meus. Obrigada pelo eterno amor e estímulo nos momentos em que eu pensava que não ia conseguir. Sem vocês, hoje, tudo isso seria impossível. Eu amo vocês!

Ao CNPq, CAPES, FAPERJ e FUJB pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

1) INTRODUÇÃO	2 - 26
1.1) Fungos filamentosos	2
1.2) <i>Pseudallescheria boydii</i> / <i>Scedosporium apiospermum</i>	3
1.3) Aspectos da patogênese fúngica	8
1.4) A superfície dos fungos e sua importância na interação com o hospedeiro	9
1.5) Enzimas proteolíticas: alvo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos com ação antifúngica:	15
1.6) Secreção de moléculas em fungos e sua importância na interação com o hospedeiro	22
2) OBJETIVOS	28 - 29
2.1) Objetivos Gerais	28
2.2) Objetivos específicos	29
3) MATERIAL E MÉTODOS	31 - 49
4) RESULTADOS	51 - 96
5) DISCUSSÃO	98 - 112
6) CONCLUSÕES	114 - 115
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117 - 135
8) ANEXOS	137

RESUMO

Bianca Alcântara da Silva

Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre aspectos múltiplos da bioquímica e biologia celular do fungo *Pseudallescheria boydii*.

Orientadores: André Luis Souza dos Santos e Eliana Barreto-Bergter

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Pseudallescheria boydii (anamorfo *Scedosporium apiospermum*) é um fungo oportunista que pode causar infecções graves em seres humanos. O tratamento da pseudallescheriose é difícil, uma vez que esse fungo possuiu resistência intrínseca a maioria dos antifúngicos comumente utilizados na clínica. Nesse contexto, inibidores de metalopeptidases, tendo como base íons metálicos, representam um novo grupo de agentes com potencial antifúngico. No presente trabalho, testamos o efeito de diferentes inibidores de metalopeptidases {1,10-fenantrolina, 1,10-fenantrolina-5,6-dione (fendio), [Cu(fendio)₃](ClO₄)₂·4H₂O e [Ag(fendio)₂]ClO₄} sobre o desenvolvimento de *P. boydii*. O pré-tratamento de conídios ou hifas de *P. boydii* por 20 h com os compostos derivados de 1,10-fenantrolina levou a uma significativa inibição da viabilidade fúngica, bem como bloqueou a diferenciação celular.

Microrganismos presentes em biofilmes são mais resistentes as ações do sistema imunológico e de antimicrobianos. Nesse estudo, demonstramos que o pré-tratamento dos conídios com os derivados de 1,10-fenantrolina diminuiu a formação de biofilme por este fungo. Além disso, a incubação dos conídios por 1 h com os derivados de 1,10-fenantrolina a 0,1 µg/ml também inibiu o processo de interação dos conídios com células hospedeiras, sem qualquer perda da viabilidade fúngica. Os inibidores não apresentaram citotoxicidade para várias linhagens celulares testadas até a concentração de 1 µg/ml, o que nos abre a possibilidade de estudar o uso destes compostos, isoladamente ou em associação com antifúngicos clássicos, em um futuro ensaio clínico. Além disso, através de citometria de fluxo, observou-se que o composto derivado de cobre foi capaz de inibir a expressão de glicoconjugados ricos em manose e/ou glucose na superfície dos conídios, bem como a expressão de peptideoamnomanana, uma importante adesina fúngica. Adicionalmente, demonstramos que conídios de *P. boydii* apresentam em sua superfície moléculas

com capacidade de se ligar à fibronectina, uma importante proteína de matriz extracelular. A 1,10-fenantrolina e seus derivados foram capazes de inibir a expressão destas moléculas na superfície do fungo. Observamos também que conídios de *P. boydii* foram capazes de se ligar à fibronectina imobilizada de forma específica e de forma dose dependente. Ensaio de imunofluorescência demonstraram que essas moléculas estão presentes tanto nos conídios como nas hifas. Análises imunocitoquímicas demonstraram a presença das moléculas ligadoras à fibronectina localizadas na parede celular e em compartimentos intracelulares relacionados com vesículas citoplasmáticas. A fibronectina e anticorpos anti-fibronectina inibiram o processo de interação de *P. boydii* com células epiteliais e fibroblastos. Coletivamente, esses resultados sugerem que as moléculas ligadoras de fibronectina são requeridas para processos de interação de *P. boydii* e estas moléculas podem ser importantes para mecanismos de aderência e invasão fúngica.

O estudo da secreção de moléculas é um meio importante para a compreensão da patogenia de muitos microrganismos. Nós demonstramos que proteínas presentes no sobrenadante de *P. boydii* reagiram com soro de paciente com pseudallescheriose, sugerindo uma associação das moléculas secretadas com a patogênese fúngica. Em seguida, através de estudos proteômicos avaliamos as proteínas secretadas por *P. boydii*. Vinte e duas proteínas foram identificadas no secretoma de *P. boydii*, incluindo proteínas de via glicolítica (triosefosfato isomerase, malato desidrogenase, frutose-1,6-bisfosfato, aldolase, fosfoglicerato mutase), proteínas associadas ao citoesqueleto (dineína e cofilina) e outras proteínas importantes para o metabolismo fúngico (aspártico peptidase, permease, fosfatase, esteróide 5- α -redutase, aspartato semi-aldeído desidrogenase, fosfomanumutase, proteína quinase, manitol-1-fosfato-desidrogenase). Testes bioquímicos corroboraram a presença das enzimas adenilato quinase, manitol 1,5-fosfato desidrogenase, triosefosfato isomerase, malato desidrogenase, aldolase e aspártico peptidase no sobrenadante de *P. boydii*.

Coletivamente nossos resultados demonstraram que 1,10-fenantrolina e seus derivados foram capazes de inibir processos vitais da biologia de *P. boydii* bem como etapas importantes da interação do fungo com células hospedeiras, abrindo uma nova perspectiva para o uso destes compostos na quimioterapia alternativa da pseudallescheriose.

Palavras chave: *Pseudallescheria boydii*, Peptidase, Inibidores proteolíticos, Proteômica.

Rio de Janeiro
Julho de 2009

ABSTRACT

Bianca Alcântara da Silva

Effect of 1,10-phenanthroline and its derivatives on multiple aspects of biochemistry and cell biology of the fungus *Pseudallescheria boydii*.

Orientadores: André Luis Souza dos Santos e Eliana Barreto-Bergter

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Pseudallescheria boydii (anamorph *Scedosporium apiospermum*) is an opportunistic fungus that causes serious infections in humans. The treatment of pseudallescheriosis is difficult since *P. boydii* exhibits intrinsic resistance to the majority antifungal drugs used in the clinic. In this context, metal-based metalloproteinase inhibitors represent a novel group of antifungal agents with potential applications for the control of fungal infections. In this work, we have tested the effect of different metalloproteinase inhibitors {1,10-phenanthroline, 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendio), [Cu(phendio)₃](ClO₄)₂·4H₂O e [Ag(phendio)₂]ClO₄} on *P. boydii* development. The pre-treatment of conidial and/or hyphae cells for 20 h with these compounds promoted a powerful inhibition of *P. boydii* growth as well as blocked the cellular differentiation.

Microorganisms-forming biofilms are more resistant to the immune system and to the antibiotics. In this study, we demonstrated that the pre-treatment of the conidial cells with 1,10-phenanthroline and its derivatives decreased the biofilm formation by this fungus. Moreover, the incubation of conidia for 1 h with the 1,10-phenanthroline derivatives at 0.1 µg/ml also drastically inhibited the interaction process between conidia and host cells, without any loss of fungal viability. Interestingly, the 1,10-phenanthroline compounds were not toxic to several cell lineages up to 1 µg/ml, which opens the possibility to study the use of these chemical compounds, alone or in association with classical antifungal agents, in a future clinical trial. Additionally, by means of flow cytometry we observed that the Cu⁺²-phendio derivative inhibited the expression of glycoconjugates rich in mannose and/or glucose at the surface of the conidial cells, as well as the expression of peptideoramnomann (a fungal adhesin). In addition, we demonstrated for the first time that conidial cells of *P. boydii* presented surface molecules capable of binding to fibronectin, an

important protein of extracellular matrix. Also, the 1,10-phenanthroline and its derivatives inhibited the expression of fibronectin-binding molecules on the surface of *P. boydii*.

The extracellular matrix proteins are involved in the attachment of a variety of pathogens to the host cells; therefore, the study of the ability of microorganisms to bind to these proteins is very important. In this context, we studied the molecules capable of binding fibronectin in *P. boydii*. We observed that conidia were able to bind to immobilized fibronectin on microtiter plates in a specific and concentration-dependent manner. By immunofluorescence assays we demonstrated that both hyphae and conidial cells of *P. boydii* exhibited the ability to bind fibronectin. Immunocytochemical analysis demonstrated that molecules capable of binding to fibronectin localizes at the cell wall and in the cytoplasmic compartment resembling vesicles. Soluble fibronectin and anti-fibronectin antibody significantly inhibited the interaction of *P. boydii* with epithelial and fibroblast cell lineages. Collectively, these results suggested that molecules capable of binding to fibronectin are required for interaction process.

The study of the secretion of molecules is an important approach for understanding the pathogenicity of many microorganisms. We demonstrated that protein in the supernatant of *P. boydii* reacted with antibodies present in the serum from patients with pseudallescheriosis, suggesting an association between secretion of antigenic proteins and pathogenesis. Then, through proteomic analysis we have assessed the identification of secreted proteins by *P. boydii* mycelia. Twenty two proteins were identified, including proteins belonging to the glycolytic pathway (triosefosfate isomerase, malate dehidrogenase, fructose-1,6-biphosphate, aldolase, phosphoglicerate mutase), protein associated to cytoskeleton (dinein and coffilin) and proteins related to virulence such as aspartic peptidase, phosphatase and peroxiredoxin. Biochemical tests indicated activities of adenylate kinase, mannitol 1,5-phosphate dehidrogenase, triosefosfato isomerase, malate dehidrogenase, aldolase and aspartic peptidase in supernatant of *P. boydii*.

Collectively, our results showed that 1,10-phenanthroline and its derivatives were able to inhibit vital processes of the biology of *P. boydii* as well as important steps in the interaction of the fungus to host cells, opening a new perspectives for the use of these compounds in an alternative chemotherapy of pseudallescheriose.

Keywords: *Pseudallescheria boydii*, Peptidase, Proteolytic inhibitors, Proteomic.

Rio de Janeiro
Julho de 2009

ABREVIATURAS

2DE – eletroforese bi-dimensional

A549 – célula epitelial pulmonar humana

ABPA – aspergilose broncopulmonar alérgica

ADP – difosfato de adenosina

Ag²⁺-fendio – Ag(fendio)₂]ClO₄

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida

ATP – trifosfato de adenosina

BSA – soro albumina bovina

C6/36 – célula de mosquito *Aedes albopictus*

CC₅₀ – concentração citotóxica para 50% das culturas de células

CHO – célula de ovário de hamster chinês

CMH – monohexosilceramida

Con A – concanavalina A

Cu²⁺-fendio – [Cu(fendio)₃](ClO₄)₂.4H₂O

DMEM – Dubelco's modified Eagle medium

DMSO – dimetilsulfóxido

DO – densidade óptica

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etileno-diamino tetracético

EGTA – etileno glicol-bis (β-aminoetil éter)

ELISA – ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

FACS – citômetro de fluxo

Fendio – 1,10-fenantrolina-5,6-dione

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FN – fibronectina humana

GPI – glicosilfosfatidilinositol

HEp2 – células de carcinoma de laringe humana

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HPTLC – cromatografia em camada fina de alta resolução

HSA – soro albumina humana

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

kDa – kilodalton

LLC-MK2 – célula de rim de macaco *Rhesus*

MØ – macrófagos de camundongo

MA-104 – célula embrionária de rim de macaco *Rhesus*

MALDI – desorção e Ionização a Laser assistida por Matriz (“Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization”)

MRC-5 – fibroblasto de pulmão humano

MS – espectometria de massa

MyD88 – Gen 88 de resposta primária a diferenciação mielóide (“Myeloid differentiation primary response gene 88”)

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo

OPD – orto-fenilenodiamina

p – piranose

PBS – tampão fosfato salina

pH – potencial de hidrogênio

PI – ponto isoelétrico

PLB – fosfolipase B

PMN – células polimorfonucleares

PMSF – fluoreto de fenilmetanosulfonil

PRM – peptideoramnomana

Ram – ramnose

RAW – macrófagos murinos

SAP – aspártico peptidase secretada

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SFB – soro fetal bovino

TGO - aspartato aminotransferase

TGP - alanina aminotransferase

TLCK - N-*p*-tosil-L-lisina-clorometil cetona

TLR - receptor do tipo "toll"

TNF - Fator de necrose tumoral

TOF - tempo de vôo ("time of flight")

TPCK - L-1-tosilamido-2-feniletil clorometil cetona

Tris - tris-hidroximetilamianometano

UFC - unidades formadoras de colônia

Vero - célula de rim de macaco

Introdução

1) INTRODUÇÃO

1.1) Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos constituem um grupo de organismos eucarióticos multicelulares. Possuem organelas citoplasmáticas como mitocôndrias, retículo endoplasmático, vacúolos, complexo de golgi e ribossomos. Seu núcleo é haplóide e apresenta vários cromossomos. O citoplasma encontra-se limitado pela membrana citoplasmática que apresenta na sua constituição moléculas de ergosterol, o que a difere das células eucarióticas humanas que apresentam o colesterol como esterol de membrana. Revestindo toda a membrana celular encontramos a parede celular, composta fundamentalmente por proteínas e polissacarídeos como quitina, mananas e glucanas (ALEXOPOULOS, MIMS & BLACKWELL, 1996; MUELLER & SCHMIT, 2006). Esses organismos são caracteristicamente cosmopolitas e amplamente distribuídos em uma variedade de ecossistemas. Apesar de serem conhecidas cerca de 250.000 espécies de fungos, somente 150-200 espécies já foram descritas como patógenos de homens e animais (MUELLER & SCHMIT, 2006).

Observa-se nos fungos filamentosos a formação microscópica de estruturas tubulares ramificadas, de crescimento apical, conhecidas como hifas. Essas hifas podem ser hialinas ou demáceas, septadas ou asseptadas. As hifas se agrupam formando o micélio, que se observa pela formação macroscópica de colônias cotonosas ou pulverulentas sobre meios sólidos. Na colônia de um fungo filamentoso ocorre uma diferenciação na função do micélio. Assim, o micélio vegetativo penetra no substrato para obter nutrientes, enquanto o micélio aéreo projecta-se ao exterior da colônia para produzir estruturas reprodutoras. A reprodução ocorre pela formação de esporos exógenos ou endógenos de origem assexuada e/ou sexuada. Os conídios são esporos exógenos de reprodução assexuada (ADRIO & DEMAIN, 2003).

Os fungos filamentosos estão comumente associados à matéria orgânica em decomposição, participando dos ciclos naturais reciclando carbono e outros elementos, ou como patógenos oportunistas em plantas e/ou animais. Os fungos apresentam metabolismo quimioheterotrófico. Esses organismos têm a propriedade de excretar enzimas que metabolizam os nutrientes no meio extracelular para que os mesmos possam utilizar os metabólitos resultantes da catálise enzimática. Este fato tem favorecido a descoberta de exoenzimas de grande importância médica e biotecnológica (TILBURG & THOMAS, 1993; BOUWS, WATTENBERG & ZORN, 2008). A maioria dos fungos filamentosos é pouco exigente no que diz respeito a requerimentos de pH e temperatura, tendo a capacidade de crescer em faixas de pH entre 2 e 9 e temperaturas que oscilam entre 10 e 40°C (MUELLER & SCHMIT, 2006).

Nas últimas décadas, o aumento do número de pacientes imunocomprometidos gerou uma condição para que fungos, que normalmente são microrganismos sapróbios ou ambientais de patogenicidade reduzida, se convertessem em patógenos capazes de causar doenças com alta letalidade (BENNETT, IZUMIKAWA & MARR, 2004; MARR, 2008). De fato, é observado na literatura um aumento na incidência de infecções sistêmicas e alteração no espectro dos agentes etiológicos (PONTÓN *et al.*, 2000; NUCCI, 2003). Novos patógenos fúngicos e novas formas clínicas de processos classicamente estudados na micologia médica vêm sendo crescentemente descritos (PONTÓN *et al.*, 2000; NUCCI, 2003).

Infecções causadas por leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* e por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* compreendem, até o momento, 90% de todos os processos fúngicos descritos (RUHNKE & MASCHMEYER, 2002). Porém, outras espécies de fungos filamentosos, principalmente espécies de *Fusarium* spp., *Pseudallescheria/Scedosporium*, hifomicetos demáceos e zigomicetos vêm sendo cada vez mais reconhecidas como agentes de doenças sistêmicas (PONTÓN *et al.*, 2000; NUCCI, 2003).

1.2) *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum*

P. boydii (anamorfo *Scedosporium apiospermum*) pertence ao domínio Eukarya, filo Ascomycota, classe Euascomycetes, ordem Microascales, família Microascaceae, gênero *Pseudallescheria* e espécie *P. boydii* (CORTEZ *et al.*, 2008). É um fungo amplamente distribuído na natureza, encontrado principalmente como saprófita de águas de rios, solo, estrumes, lamas de esgoto, pântanos e esterco. Este fungo apresenta maior incidência em áreas temperadas e subtropicais (RIPPON, 1988; KALTSEIS, RAINER & DE HOOG, 2009). Apesar de ser frequentemente isolado de indivíduos imunocomprometidos, *P. boydii* só teve sua importância médica reconhecida em 1948, quando BENHAM & GEORGE reportaram um caso de meningite causada por esta espécie. Este atraso no reconhecimento de *P. boydii* como patógeno de importância médica pode ser devido à difícil classificação taxonômica do fungo (RIPPON, 1988).

P. boydii é um fungo homeotático, onde no mesmo micélio podemos observar estruturas de reprodução sexuada e assexuada. O estado teleomórfico, onde se observa a reprodução sexuada, se caracteriza pela presença de cleistotécio (**Fig. 1A**), que é uma estrutura globosa, apresentando uma coloração escura, com paredes espessas (em média 5 µm), compostas de duas a três camadas de hifas septadas. Dentro dessas estruturas estão localizados os ascos, contendo em média oito ascósporos (4 × 8 µm), que são liberados para o meio ambiente quando ocorre a ruptura do cleistotécio. Para o anamorfo de *P. boydii*, *S. apiospermum*, onde somente a reprodução assexuada é observada, as hifas são hialinas, septadas, apresentando ramificações, com a presença de conídios únicos, ovais, medindo de 6 a 8 µm,

em uma hifa diferenciada conhecida como conidióforo (FISHER & COOK, 1998; GUARRO *et al.*, 2006) (**Fig. 1B**).

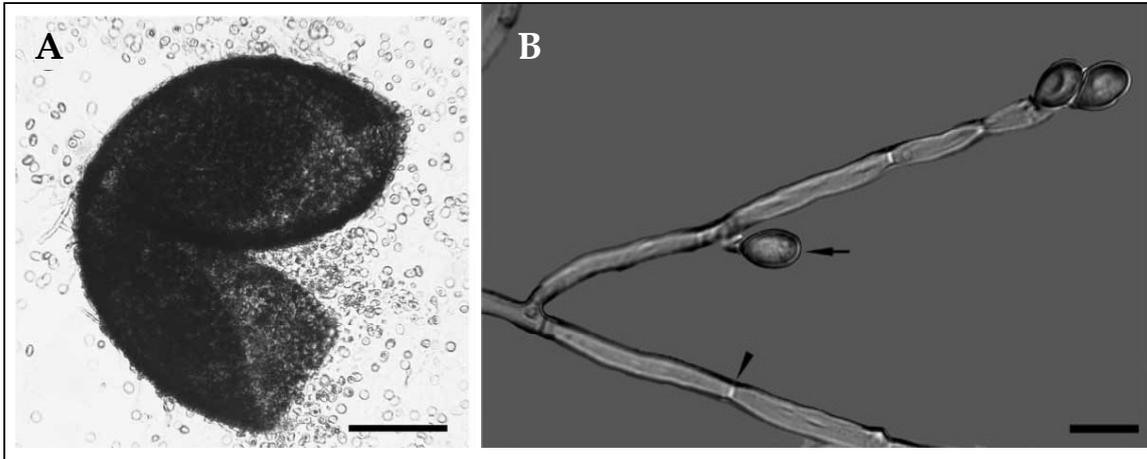


Figura 1: Morfologia de *P. boydii*. **(A)** Cleistotécio. **(B)** Hifas hialinas septadas (septos indicados por cabeça de seta) com conídio em sua extremidade (seta). Fontes: GILGADO *et al.*, 2009 e CORTEZ *et al.*, 2008.

P. boydii cresce facilmente em meio Sabouraud, produzindo colônias de coloração clara que tendem a se tornar mais escuras, apresentando a aparência macroscópica de colônias algodonosas. A formação do cleistotécio pode ser observada quando se cultiva o fungo em meios mais pobres como o ágar batata ou ágar de farinha de milho (KWON-CHUNG & BENNET, 1996; CORTEZ *et al.*, 2008).

Apesar de ser geralmente considerado um patógeno oportunista, *P. boydii* é o principal agente causador do micetoma micótico (**Fig. 2**), que é uma infecção fúngica que acomete pacientes imunocompetentes. O micetoma micótico é uma infecção subcutânea crônica, normalmente ocasionada por introdução traumática do agente infeccioso no tecido, apresenta uma maior incidência nos membros inferiores e superiores, podendo ser causado por fungos (eumicetoma ou micetoma micótico) ou por actinomicetos (actinomicetoma). No micetoma pode-se observar o acometimento dos tecidos cutâneo e subcutâneo e tecidos moles, sendo ainda possível a extensão da infecção aos tendões, ligamentos e ossos. A patologia é caracterizada por supuração, formação de abscesso, granuloma e sinus contendo grânulos de coloração branca amarelada contendo microcolônias do fungo envolvido com debris do tecido (KWON-CHUNG & BENNET, 1996; CORTEZ *et al.*, 2008).



Figura 2: Exemplos de micetomas micóticos. Fontes: GUARRO *et al.*, 2006 e CORTEZ *et al.*, 2008.

P. boydii é capaz de causar infecções similares, em termos de variedade e predisposição, às infecções causadas por espécies do gênero *Aspergillus*. Essas infecções incluem colonização pulmonar (GARCÍA *et al.*, 2003; SEVERO *et al.*, 2004; PIHET *et al.*, 2009), pneumonias invasivas (STEINBACH *et al.*, 2003), micose broncopulmonar alérgica, uveítes, sinusites (THIAGALINGAM *et al.*, 2004), endocardites (O'BRYAN *et al.*, 2002), abscessos cerebrais (MONTEJO *et al.*, 2002; SAFDAR *et al.*, 2002; KANAFANI *et al.*, 2004), infecções cutâneas e subcutâneas (CHAVEIRO *et al.*, 2003), bola fúngica (GARCÍA *et al.*, 2003; WILLINGER *et al.*, 2003), otites (BHALLY *et al.*, 2004) e micoses sistêmicas e disseminadas (DE HOOG *et al.*, 1994; RAJ *et al.*, 2002; BUZINA *et al.*, 2006).

O pulmão é o segundo sítio mais comum de infecção por *P. boydii* (Fig. 3) e a doença pulmonar pode ser classificada em três grupos: (i) alérgica, (ii) de colonização intracavitária e (iii) invasiva (SEVERO, PORTO & LONDERO, 1998). MILLER e colaboradores (1993) descreveram dois casos de pacientes com aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) recorrente e que apresentaram uma exacerbação da micose broncopulmonar alérgica devido à colonização por *P. boydii*, apresentando imunoglobulina E (IgE) total, IgG e IgE específica, teste cutâneo e preceptina para este fungo, acompanhados de um quadro clínico bem definido para pseudallescheriose broncopulmonar alérgica. A doença pulmonar invasiva por *P. boydii* pode se caracterizar pela presença de um nódulo solitário assintomático ou por uma pneumonia necrotizante, fatal na maioria dos casos (SEVERO, PORTO & LONDERO, 1998). Em indivíduos não imunossuprimidos, o isolamento do fungo a partir do escarro, demonstra uma colonização transiente dos brônquios e/ou pulmões, principalmente, cavidades previamente formadas

devido à tuberculose ou à fibrose cística, as quais são condições que predispõem à colonização intracavitária com a posterior formação de bola fúngica (**Fig. 3A**) (TRAVIS, ROBERTS & WILSON, 1985). *P. boydii* é o segundo fungo filamentoso encontrado mais frequentemente em pacientes com fibrose cística, com um índice de prevalência de 8,6% (PIHET *et al.*, 2009); nessa condição clínica, estima-se que as alterações prévias no epitélio broncopulmonar decorrentes da infecção bacteriana e da resposta inflamatória, sejam fatores que predispõem à infecção fúngica (ZOUHAIR *et al.*, 2001; PIHET *et al.*, 2009).

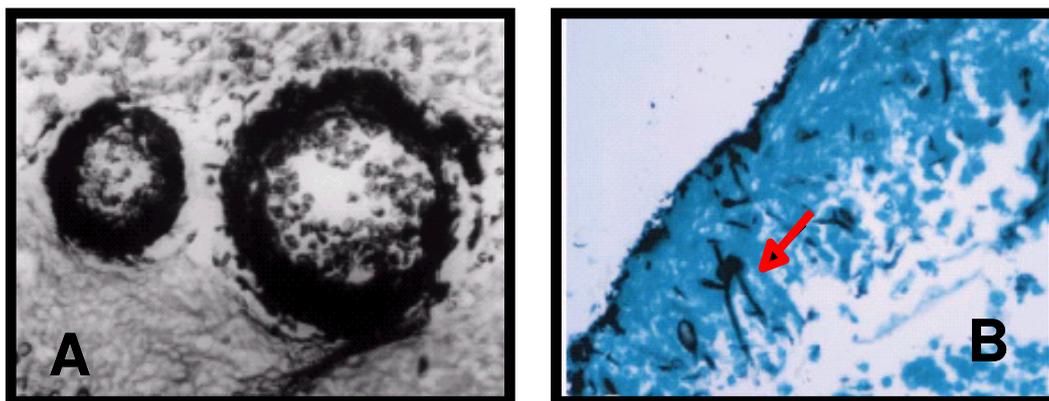


Figura 3: (A) Histopatologia demonstrando a bola fúngica na cavidade pulmonar (Fonte: Severo *et al.*, 2004). (B) Histopatologia demonstrando a presença de *P. boydii*, formando tubo germinativo (seta) no tecido pulmonar (Fonte: NONAKA *et al.*, 2002).

A morfologia de *P. boydii* no tecido infectado é idêntica a de diversos outros agentes que causam infecções fúngicas oportunistas, isto é, a presença de hifas hialinas septadas é semelhante à colonização por espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e outros. O *P. boydii* e o *Aspergillus* sp. podem coexistir em uma mesma infecção e, portanto, a presença dos dois gêneros dificulta o diagnóstico diferencial a nível clínico, histopatológico, e principalmente pelas diferenças nas respostas as drogas antifúngicas (RIPPON, 1988; FENELON *et al.*, 1999; PIHET *et al.*, 2009).

Um outro tipo de manifestação clínica descrita em quadros causados pelo *P. boydii* é exemplificado pela formação de abscessos cerebrais causados pela aspiração de água contaminada (RUCHEL & WILICHOWSKI, 1995). Os fungos que comumente causam infecções no sistema nervoso central são espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*. No entanto, com o aumento na prevalência de indivíduos imunocomprometidos, outros fungos têm emergido como importantes causadores de doenças do sistema nervoso central. Entre esses agentes emergentes, *P. boydii* é um relativamente raro, mas bem documentado, patógeno potencial do sistema nervoso central, sendo letal na maioria dos casos (NESKY, MCDOUGLAS & PEACOCK, 2000). Em indivíduos imunocompetentes, algumas situações, como

mecanismos de drenagem do líquido cérebro espinhal ou mesmo uma raquianestesia podem levar a um processo de meningite crônica causada por *P. boydii* (POZA *et al.*, 2000).

No Brasil, LOPES e colaboradores (1994) e SEVERO e colaboradores (1997) relataram alguns casos de nódulos subcutâneos causados por *P. boydii*, possivelmente de origem não traumática, em pacientes imunossuprimidos por tratamento com drogas imunossupressoras após transplantes de órgãos. GINTER e colaboradores (1999) registraram um caso de pseudallescheriose cutânea atípica e que era refratária aos antifúngicos. Um outro caso de pseudallescheriose cutânea no Brasil foi relatado por BONAMIGO e colaboradores (2007). Os autores apresentaram nesse trabalho um caso clínico de uma paciente diabética usuária de corticoesteróide sistêmico para o tratamento de artrite reumatóide e que apresentou úlceras cutâneas por *S. apiospermum*. A paciente em questão havia feito uso do itraconazol, porém sem sucesso na resolução da infecção. A administração de voriconazol debelou a infecção, sendo este agente antifúngico considerado como uma nova alternativa para o controle de infecções por fungos resistentes.

SEVERO e colaboradores (2004) reportaram quatro casos de colonização intracavitária (bola fúngica) do trato respiratório por *S. apiospermum*. Foi enfatizada, no estudo, a necessidade de uma busca minuciosa de conídios do fungo, a fim de estabelecer o diagnóstico etiológico no espécime clínico, evitando assim a administração de uma terapia inadequada, pois o tratamento das infecções causadas por *P. boydii* é complicado devido à resistência do fungo a drogas antifúngicas clássicas, como por exemplo, anfotericina B (CORTEZ *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009).

Como mencionado anteriormente, *P. boydii* pode ser confundido no tecido com outros fungos filamentosos, o que faz com que infecções sistêmicas ocasionadas por esse fungo possam ser facilmente confundidas com outros quadros causados por espécies hialinas, como as pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* (NUCCI, 2003). Considerando que a anfotericina B é a droga de escolha para o tratamento da aspergilose e *P. boydii* é resistente a essa droga, tal erro resultaria numa terapia inadequada. Essa é potencialmente uma das razões para uma alta taxa de mortalidade por pseudallescheriose invasiva (RAINER *et al.*, 2000; GONZÁLEZ *et al.*, 2003).

Nos últimos anos a droga de escolha para o tratamento da pseudallescheriose vem sendo o itraconazol (CHAVEIRO *et al.*, 2003). Porém, devido ao isolamento de algumas cepas de *P. boydii* resistentes ao itraconazol, o voriconazol (triazol de segunda geração derivado do fluconazol) tem emergido como uma potente droga antifúngica utilizada no tratamento de pseudallescheriose pulmonar invasiva, disseminada e pseudallescheriose do sistema nervoso central (KANAFANI *et al.*, 2004; BONAMIGO *et al.*, 2007). Há ainda, no entanto, um outro fator a ser considerado: devido à existência de múltiplas interações medicamentosas do voriconazol com outras drogas administradas na clínica, o que inclui drogas utilizadas com fins de imunossupressão em pacientes transplantados, nem

sempre seu uso é possível. Neste caso, a droga de escolha para o tratamento das pseudallescherioses permanece desconhecida (O'BRYAN *et al.*, 2005). Com base em dados obtidos em testes *in vitro*, a caspofungina (pertencente à classe das equinocandinas), posaconazol e ravuconazol (triazoles) apresentam-se como alternativas em potencial (MELETIADIS *et al.*, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2003). Utiliza-se também como tratamento, principalmente da bola fúngica, a intervenção cirúrgica, com a finalidade de remover o tecido lesionado pelo fungo (GARCÍA *et al.*, 2003; GONZÁLEZ *et al.*, 2003).

1.3) Aspectos da patogênese fúngica

A patogenicidade de um microrganismo é definida como sendo sua capacidade de causar dano ao hospedeiro, o que define o quadro de doença. A prevenção ou a ocorrência da doença dependerá de vários aspectos da interação entre o agente causador e o hospedeiro (GHANNOUM & ABU-ELTEEN, 1990; CASADEVALL & PIROFSKI, 1999).

O meio ambiente é o principal reservatório fúngico, por isso, o contágio através do contato entre indivíduos é menos frequente e a maioria das infecções são contraídas a partir de fontes na natureza. Todavia, algumas infecções oportunistas podem ter origem na própria microbiota (WINGARD, 1999; KALTSEIS, RAINER & DE HOOG, 2009).

HOGAN, KLEIN & LEVITZ (1996) em uma revisão de literatura observaram que várias espécies de fungos exibem como fatores responsáveis pela virulência a capacidade de crescimento à temperatura corpórea hospedeira (37°C) e em pH fisiológico, a transição morfológica, a presença de propágulos infecciosos de tamanho compatível com a deposição alveolar, a composição química da parede celular, a produção de enzimas hidrolíticas (associadas às células ou secretadas), a expressão de proteínas ligadoras de componentes de matriz extracelular, a produção de toxinas e de adesinas, e, por fim, dentre outros fatores não mencionados aqui, a expressão de polissacarídeos capsulares e pigmentos.

Para os organismos que são infectados por fungos, o primeiro contato hospedeiro-patógeno é mediado pela parede celular, o que confere a essa estrutura uma importante função no reconhecimento célula-célula, envolvimento nos processos de adesão, invasão e um sítio importante para localização de moléculas antigênicas como glicoconjugados e enzimas (CABIB *et al.*, 1988; NIMRICHTER *et al.*, 2005).

1.4) A superfície dos fungos e sua importância na interação com o hospedeiro

Por meio das estruturas existentes em sua superfície os microrganismos interagem com o meio abiótico e com seus respectivos hospedeiros. Dentre estas moléculas, as adesinas são responsáveis pela aderência de bactérias e fungos as células hospedeiras. Sabe-se que a aderência de microrganismos

patogênicos a tecidos do hospedeiro é considerada um pré-requisito para a sua disseminação e um passo essencial para o estabelecimento da infecção (LIMA *et al.*, 2001). Neste contexto, vários estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de entender melhor as moléculas envolvidas nestes processos.

A parede celular, por ser normalmente a estrutura mais externa da célula fúngica, compreende várias moléculas importantes no processo de interação do fungo com componentes do ambiente e receptores do hospedeiro. Essa estrutura é de vital importância para a célula fúngica, essencialmente por conferir proteção física e osmótica. Compreendendo cerca de 20 a 30% do peso seco da célula, a parede celular se caracteriza por ser uma estrutura que confere rigidez, protegendo a célula de injúrias mecânicas, estando diretamente envolvida com a morfogênese fúngica (CABIB *et al.*, 1997; PONTÓN, 2008). A parede celular também funciona como barreira filtrante, impedindo a passagem de moléculas de alta massa molecular e, conseqüentemente, evitando o dano à membrana plasmática (CABIB *et al.*, 1997; PONTÓN, 2008).

A composição e o arranjo molecular da parede celular são finamente reguladas e variam em resposta a uma série de condições ambientais, o que demonstra seu alto dinamismo (SMITS *et al.*, 1999; PONTÓN, 2008). Os componentes estruturais são principalmente polissacarídeos como quitina (polímero de *N*-acetilglucosamina $\beta(1\rightarrow4)$ ligadas e glucanas $\beta(1\rightarrow6)$ e $\beta(1\rightarrow3)$ ligadas. Encontram-se ligadas covalentemente ao esqueleto de glucanas as glicoproteínas da parede celular, que contêm unidades de manose em sua estrutura. As manoproteínas compreendem cerca de 40 a 50% do peso seco da parede celular (CABIB *et al.*, 1988; FONTAINE *et al.*, 2000; NIMRICHTER *et al.*, 2005) (**Fig. 4**).

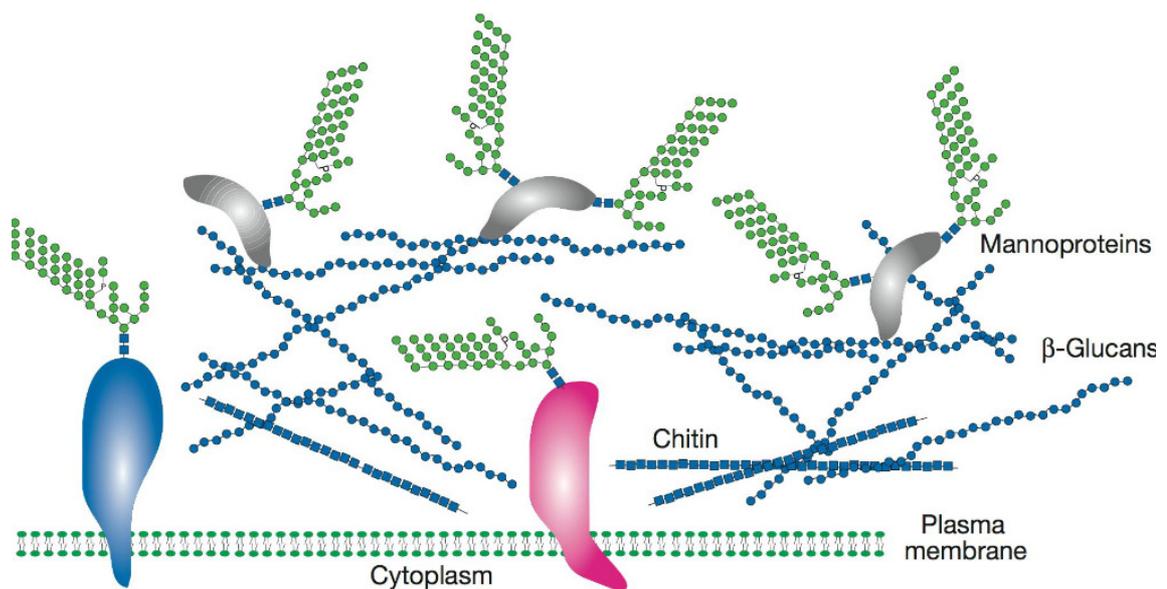


Figura 4: Estrutura da parede celular dos fungos (Fonte: VARKI *et al.*, 2008).

A parede celular dos fungos é um alvo em potencial não só para as defesas naturais do hospedeiro, mas também para agentes antifúngicos que atuam bloqueando a síntese de moléculas como as glucanas, quitina e glicoproteínas, sem interferir no metabolismo da célula hospedeira (NIMRICHTER *et al.* 2005; PONTÓN, 2008).

Tendo em vista a importância da parede celular, tanto para a biologia celular do fungo, quanto para as relações patógeno-hospedeiro, vários estudos vêm sendo realizados na tentativa de elucidar os seus aspectos estruturais e funcionais. Dentre os componentes que vêm sendo caracterizados pode-se citar a presença de enzimas hidrolíticas (KNEIPP *et al.*, 2004; KIFFER-MOREIRA *et al.*, 2007), proteínas de choque térmico (MATTHEWS & BURNIE, 2004), glicoesfingolipídeos (RODRIGUES *et al.*, 2000), melanina (NOSANCHUK & CASADEVALL, 2003) e histonas (NOSANCHUK *et al.*, 2003).

Com relação a *P. boydii*, até o momento, pouco se conhece sobre suas estruturas de superfície e possíveis fatores de virulência (SANTOS *et al.*, 2009). Dentre os candidatos bem caracterizados a reguladores da interação fungo-hospedeiro destacam-se o peptidopolissacarídeo denominado de peptidoramnomanana - PRM (PINTO *et al.*, 2001, 2004, 2005), o glicoesfingolipídeo monohexosilceramida (PINTO *et al.*, 2002) e o polissacarídeo α -glucana (BITTENCOURT *et al.*, 2006). As funções atribuídas a essas moléculas são descritas a seguir.

PINTO e colaboradores (2001) isolaram e caracterizaram parcialmente a estrutura de uma peptidoramnomanana (PRM) antigênica de formas micelianas de *P. boydii*, que apresenta cadeias laterais de Ramp (1→3) e Ramp ligadas (1→3) a uma cadeia principal de manose (1→6) ligada. A PRM apresentou baixa reatividade com soro hiperimune de coelho anti-PRM de *Sporotrix schenckii* e reagiu fortemente com o anti-soro de *P. boydii*. As diferenças imunológicas, supostamente, se devem as diferenças estruturais entre as cadeias laterais de ramnose das PRMs de ambos os fungos. A PRM também foi detectada nas formas conidiais de *P. boydii* através de imunofluorescência. Em estudos posteriores, PINTO e colaboradores (2005) realizaram a de-O-glicosilação da molécula de PRM, observando que após a remoção dos oligossacarídeos O-ligados sua antigenicidade diminuía em aproximadamente 75%. Esses dados sugerem fortemente que a PRM caracterizada em *P. boydii* possui propriedades antigênicas particulares, as quais se apresentam úteis para sua utilização com fins de realização de um diagnóstico específico das infecções causadas por este fungo (PINTO *et al.*, 2004). Além da aplicação como antígeno diagnóstico, a PRM parece ter também funções relacionadas à patogenicidade, de acordo com estudo de PINTO e colaboradores (2004). O pré-tratamento de conídios com anticorpo anti-PRM, bem como o tratamento de células de carcinoma de laringe humana (HEp2) com a molécula de PRM solúvel levaram à uma significativa diminuição na adesão e na internalização de conídios pelas células HEp2 em relação ao controle. A PRM solúvel foi capaz de se ligar a um

polipeptídeo de 25 kDa na superfície de HEP2, o que sugere um papel como molécula adesiva no processo de interação com o hospedeiro. Resultados similares foram observados em ensaios de interação com células A549 (SANTOS *et al.*, 2009).

Sabe-se que a diferenciação de conídio a micélio é uma etapa essencial no ciclo de vida de *P. boydii* (SANTOS *et al.*, 2009). PINTO e colaboradores (2004) demonstraram que após 2 a 4 h de interação do fungo com células HEP2 era observada a formação de projeções similares a tubos germinativos. Esse processo foi associado à invasão e morte das células epiteliais. De modo interessante, quando os conídios são incubados somente com meio DMEM ou Sabouraud essas projeções são observadas somente após 6 h de incubação, o que sugere que a presença das células epiteliais contribuiu com a aceleração na formação de tubos germinativos, provavelmente por induzir mecanismos de sinalização celular que culminam com a diferenciação morfológica (PINTO *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2009).

Um segundo componente de superfície caracterizado em *P. boydii* foi a monohexosilceramida (CMH). CMH é uma molécula de natureza lipídica, pertencente à classe dos glicosíngolipídeos, expressa em virtualmente todas as espécies fúngicas patogênicas (BARRETO-BERGTER *et al.*, 2004). CMHs foram purificadas das formas micelianas de *P. boydii* e caracterizadas estruturalmente (PINTO *et al.*, 2002). As moléculas de CMH foram reconhecidas por anticorpos presentes no soro de coelhos imunizados com *P. boydii*. Anticorpos policlonais anti-CMH foram então purificados a partir de soro de coelho infectado com *P. boydii* e utilizados em ensaios de imunofluorescência. Nestes ensaios pôde-se observar que os anticorpos purificados reconheceram CMHs tanto na superfície de formas micelianas quanto nas pseudohifas (ou tubos germinativos do fungo), ao passo que nos conídios não havia a detecção desta molécula. Além disso, conídios tratados com anticorpo anti-CMH eram incapazes de desenvolver as estruturas de tubo germinativo e, por conseguinte, não havia o desenvolvimento de formas micelianas, num processo de inibição da diferenciação celular. Coletivamente estes resultados sugerem uma expressão diferencial das glucosilceramidas de acordo com a fase morfológica do fungo, bem como aludem ao fato de que as moléculas de CMH têm, possivelmente, sua biossíntese, expressão ou estrutura modificadas durante a transição conídio → micélio (PINTO *et al.*, 2002).

O terceiro grupo de moléculas de superfície de *P. boydii* com estrutura e função caracterizadas consiste de glucanas, polímeros estruturais compostos por repetições de unidades de glucose. BITTENCOURT e colaboradores (2006) isolaram e caracterizaram uma α -glucana proveniente da parede celular de *P. boydii*. Neste mesmo estudo foi avaliado o papel desta molécula como ativadora da resposta imune inata. As análises bioquímicas revelaram que a α -glucana purificada de *P. boydii* consiste em um polissacarídeo de estrutura similar ao glicogênio, também similar a moléculas produzidas por *Aspergillus fumigatus* (BAHIA *et al.*, 2003), *Mycobacterium bovis* (DINADAYALA *et al.*, 2004)

e fígado de coelhos (ZANG *et al.*, 1991). Foi reportada a importância desta molécula no processo de interação celular de conídios com macrófagos alveolares de camundongos, além de sua capacidade de modular negativamente e de maneira dose dependente o processo de interação do fungo com macrófagos (BITTENCOURT *et al.*, 2006).

A imunidade inata possui papel essencial na resistência contra infecções causadas por fungos patogênicos (GIL-LAMAGNIERE *et al.*, 2003; BITTENCOURT *et al.*, 2006). Nesse contexto, os macrófagos são considerados a mais importante linha de defesa contra estes microrganismos (MORGENSTERN *et al.*, 1997; GIL-LAMAGNIERE *et al.*, 2003). O reconhecimento de componentes celulares desses patógenos por células da imunidade inata acarreta na liberação de mediadores pró-inflamatórios e no recrutamento de células polimorfonucleares (PMNs) (LEY, 2002) que, em geral, atuam no sentido de debelar a infecção. Esse reconhecimento se dá por meio de diversos receptores, entre eles os receptores do tipo Toll (TLR) (CARPENTER & O'NEIL, 2007). Em fungos, as β -glucanas possuem um papel, já bem caracterizado, como ligantes para receptores TLR (MIYAZAKI *et al.*, 1995; KEDZIERSKA *et al.*, 2007) e como moléculas ativadoras da resposta imune (BROWN *et al.*, 2003; HOHL *et al.*, 2005). Em *P. boydii*, frações purificadas de α -glucana foram capazes de se ligar ao complexo TLR-2-CD14-MyD88 de macrófagos e células dendríticas, resultando na secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-12 (IL-12) (BITTENCOURT *et al.*, 2006). O reconhecimento da α -glucana pode ter relevância na imunomodulação durante a infecção fúngica, favorecendo a resistência do hospedeiro pela secreção de IL-12 e consequente indução de um fenótipo Th1 ou, alternativamente, contribuir para a patologia pela liberação de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, provocando injúria tecidual (BITTENCOURT *et al.*, 2006).

Recentemente, foram também caracterizadas na superfície de formas micelianas de *P. boydii* atividades enzimáticas referentes à ecto-fosfatases (KIFFER-MOREIRA *et al.*, 2007). Sabe-se que vários processos importantes para a biologia celular dos fungos são dependentes da fosforilação de proteínas (DICKMANN & YARDEN, 2000). Os processos de fosforilação nas células são controlados por enzimas do tipo quinase e fosfatases, enzimas estas que já foram descritas em vários microrganismos incluindo os fungos (KNEIPP *et al.*, 2004). Em *P. boydii* foi descrito que a ecto-fosfatase de superfície foi capaz de hidrolizar diferentes substratos fosforilados em processos modulados positivamente pela presença de Mg^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} e negativamente por Cd^{2+} e Cu^{2+} . A inibição da atividade desta enzima na presença de inibidores específicos para fosfatases ácidas e alcalinas demonstrou que o fungo apresenta ambas as atividades fosfatásicas associadas à parede celular (KIFFER-MOREIRA *et al.*, 2007).

Glicoconjugados de superfície, em especial glicoproteínas e glicolípídeos, vêm sendo descritos como moléculas importantes no processo de interação fungo-hospedeiro (SHARON & LIS, 1993; LLOYD *et*

al., 2007). Os açúcares são importantes componentes da superfície celular, e estão implicados em fenômenos como antigenicidade, sítios de ligação hormonal, fagocitose, pinocitose, reconhecimento celular e interação com matriz extracelular (LLOYD *et al.*, 2007). A matriz extracelular é um importante alvo para a adesão de microrganismos. Essa matriz é composta por várias proteínas versáteis e polissacarídeos, que são secretados localmente e montados em uma rede organizada associada à superfície das células que a produz (BOSMAN & STAMENKOVIC, 2003).

A matriz extracelular é remodelada constantemente, o que requer hidrólises realizadas por peptidases (BOSMAN & STAMENKOVIC, 2003). Nesse sentido, as principais enzimas proteolíticas envolvidas no remodelamento da matriz extracelular são as metalopeptidases (BOSMAN & STAMENKOVIC, 2003). As principais características da matriz extracelular são suas estruturas básicas como a rede de colágenos, glicoproteínas adesivas, incluindo a laminina e a fibronectina, e as proteoglicanas, que são glicoproteínas aderidas na rede de colágeno que também interagem com as células presentes na trama da matriz e as células adjacentes à matriz (BOSMAN & STAMENKOVIC, 2003). Embora a matriz extracelular seja coberta por células epiteliais e endoteliais, injúrias celulares e exposições desta matriz podem ocorrer durante processos infecciosos. As moléculas de colágeno do tipo IV formam basicamente a lâmina basal, uma região abaixo do epitélio onde a matriz se organiza em uma camada fina e rígida. A fibronectina e a laminina são exemplos de glicoproteínas adesivas com elevadas massas moleculares e que possuem múltiplos domínios funcionais (BOSMAN & STAMENKOVIC, 2003). A fibronectina (~ 440 kDa) é amplamente distribuída nos tecidos conjuntivos, ao passo que a laminina (~ 820 kDa) é encontrada especialmente na lâmina basal. Devido a seus múltiplos domínios essas proteínas auxiliam na organização da matriz extracelular bem como em processos de adesão celular (PANKOV & YAMADA, 2002; BOSMAN & STAMENKOVIC, 2003).

Estudos de adesão de moléculas microbianas a proteínas da matriz extracelular do hospedeiro vêm sendo realizados para vários patógenos, incluindo os patógenos fúngicos *Aspergillus fumigatus* (WASYLNKA *et al.*, 2000; WARWAS *et al.*, 2007), *Candida albicans* (KLOTZ *et al.*, 1991; GAUR *et al.*, 1999), *C. tropicalis* (BENDEL *et al.*, 1993), *S. schenckii* (LIMA *et al.*, 2001, 2004), *Histoplasma capsulatum* (MCMAHON *et al.*, 1995), *C. neoformans* (RODRIGUES *et al.*, 2003), *Pneumocystis carinii* (POTTRAZ *et al.*, 1994), *Penicillium marneffei* (HAMILTON *et al.*, 1999) e *Paracoccidioides brasiliensis* (GONZÁLES *et al.*, 2005; MENDES-GIANNINI *et al.*, 2006; GONZÁLES *et al.*, 2008a,b). LIMA e colaboradores (2001) demonstraram que conídios e leveduras de *S. schenckii* têm a capacidade de aderir à fibronectina de forma dose dependente. Nesse estudo, foi também demonstrado que íons cálcio foram capazes de aumentar os índices de adesão, enquanto que o tratamento com quelantes de cálcio reverteram esse processo. Ensaio de competição revelaram que a PRM de *S. schenckii* parece estar envolvida no processo de adesão à fibronectina (LIMA *et*

al., 2001). Em estudo subsequente, realizado pelo mesmo grupo, foi demonstrada a presença de proteínas ligadoras de fibronectina e laminina na superfície de conídios, leveduras e micélio de *S. schenkii*. Foi observado que as formas de levedura foram capazes de se ligar mais efetivamente às proteínas de matriz extracelular do que os conídios do fungo. Curiosamente, carboidratos extraídos da parede celular do fungo foram capazes de inibir a ligação do fungo à fibronectina, mas não à laminina, o que sugere a presença de moléculas ligadoras diferentes para cada uma das proteínas de matriz extracelular (LIMA *et al.*, 2004).

A ligação de conídios de *A. fumigatus* a proteínas da matriz extracelular (fibronectina e laminina) foi mediada por ácidos siálicos presentes na superfície celular (BOUCHARA *et al.*, 1997; WARWAS *et al.*, 2007). Em *P. brasiliensis* foi isolada e caracterizada uma adesina presente na parede celular do fungo com especificidade de ligação à laminina. Esta adesina se mostrou ainda importante no processo de interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais da linhagem VERO, uma vez que o pré-tratamento das células epiteliais com a proteína purificada promoveu uma diminuição significativa na interação do fungo com as células epiteliais (ANDREOTTI *et al.*, 2005). Mais recentemente, foi demonstrado que conídios de *P. brasiliensis* se ligam à fibronectina e ao fibrinogênio de maneira específica e dose-dependente, em processos mediados por ácidos siálicos. Ensaio de inibição revelaram uma diminuição significativa do índice de associação do fungo com células A549, quando as mesmas foram pré-tratadas com anticorpos anti-fibronectina e anti-fibrinogênio, ou quando conídios de *P. brasiliensis* foram pré-tratados com as proteínas solúveis ou com o ácido neuramínico. Esses resultados sugeriram que a ligação à fibronectina e ao fibrinogênio facilitaria a aderência do fungo às células pulmonares e que essa ligação seria mediada por glicoconjugados sialilados (GONZÁLES *et al.*, 2008a). De fato, a ligação a proteínas de matriz extracelular parece ser um passo essencial no curso da paracoccidiodomicose, uma vez que o pré-tratamento de conídios com as proteínas da matriz extracelular diminuíram a capacidade do fungo de estabelecer doença em modelo animal de infecção (GONZÁLES *et al.*, 2008b).

1.5) Enzimas proteolíticas: alvo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos com ação antifúngica:

São ainda pouco conhecidos os mecanismos pelos quais os patógenos fúngicos disseminam-se no hospedeiro humano, saindo de seus sítios iniciais e atingindo os diversos órgãos do corpo. No entanto, parece imprescindível, para o sucesso do processo infeccioso, que os fungos reconheçam e/ou degradem moléculas-chaves do hospedeiro, como por exemplo, as proteínas de matriz extracelular ou mesmo as proteínas geradas como consequência da ativação da resposta imune hospedeira. Sem

dúvida, as enzimas proteolíticas desempenham, nestas situações, papel relevante e crítico (CUTLER, 1991; HUBE, 2000; MONOD *et al.*, 2002; NAGLIK *et al.*, 2003; YANG, 2003).

As peptidases, proteases ou peptido-hidrolases (E.C. 3.4) são enzimas hidrolíticas dotadas da capacidade de clivar ligações peptídicas gerando proteínas íntegras e/ou funcionais, fragmentos protéicos ou aminoácidos livres, como consequência da hidrólise total do substrato protéico (**Fig. 5**) (RAO *et al.*, 1998; BARRETT, RAWLINGS & O'BRIEN, 2001; MONOD, 2008). Estas enzimas são classificadas com base em três critérios principais, são eles: tipo de reação catalisada, natureza química do sítio catalítico e relações evolutivas pautadas na estrutura (BARRET, 1994; RAO *et al.*, 1998).

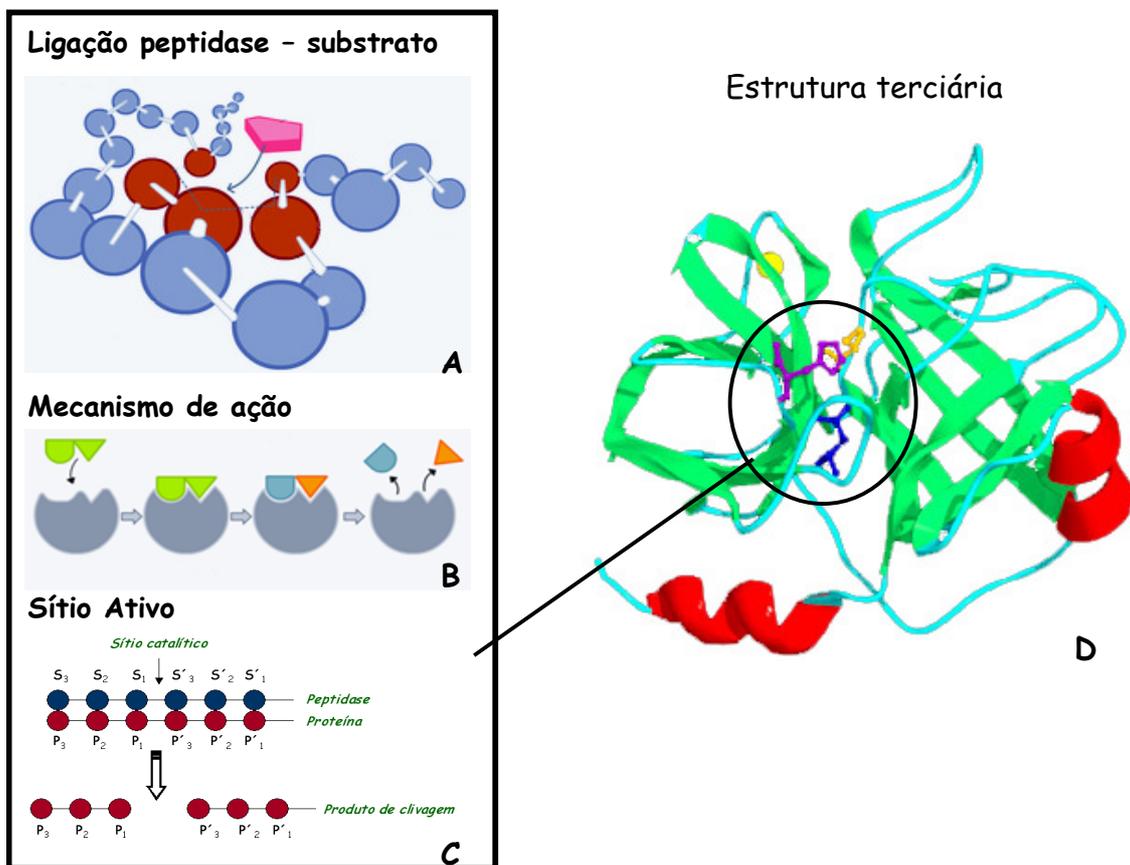


Figura 5: (A) Esquema geral da ligação do substrato (rosa) ao sítio ativo de uma peptidase (vermelho). (B) Mecanismo de ação de uma peptidase (cinza) após ligação do substrato (verde) e consequente formação do produto (azul e laranja). (C) Ligação dos aminoácidos do sítio ativo da peptidase (S'₁-S₃) aos aminoácidos específicos do substrato (P'₁-P₃). (D) Exemplo ilustrativo da estrutura terciária de uma enzima, com sítio ativo evidenciado. Fontes: Adaptado de BOND & BUTLER (1987) e MEROPS database (<http://www.merops.sanger.ac.uk>).

Em função do primeiro critério, as peptidases são classificadas como endopeptidases (E.C. 3.4.21-99) ou exopeptidases (E.C. 3.4.11-19), classificação esta que se dá em função do local da hidrólise na cadeia polipeptídica. As enzimas capazes de clivar ligações peptídicas no interior das cadeias são as chamadas endopeptidases, sendo também denominadas proteinases, ao passo que, as que clivam somente as ligações peptídicas localizadas nas extremidades das cadeias são denominadas exopeptidases. Se a hidrólise ocorre no terminal amino da cadeia polipeptídica, a peptidase é denominada aminopeptidase, dipeptidil peptidase ou tripeptidil peptidase, se há liberação de um, dois ou três aminoácidos, respectivamente, da porção N-terminal. De forma similar, caso a hidrólise ocorra no terminal carboxi, a peptidase passa a ser denominada de carboxipeptidase, peptidil peptidase ou dipeptidases (MCDONALD, 1985; BARRETT, 1986; MONOD, 2008). De acordo com o segundo critério, a classificação das peptidases é feita com base nos grupamentos químicos funcionais localizados no sítio ativo das enzimas. A partir destes, são determinadas seis subclasses principais no que diz respeito às endopeptidases. As subclasses são: aspártico, metalo, serina, cisteína, treonina e glutâmico peptidases. As exopeptidases, por sua vez, foram alocadas em três subclasses: serina, metalo e cisteína carboxipeptidases. Algumas enzimas proteolíticas não se encaixam em nenhuma destas subclasses e formam o grupo 3.4.99, de mecanismo catalítico desconhecido (BARRETT, RAWLINGS & O'BRIEN, 2001) (Fig. 6).

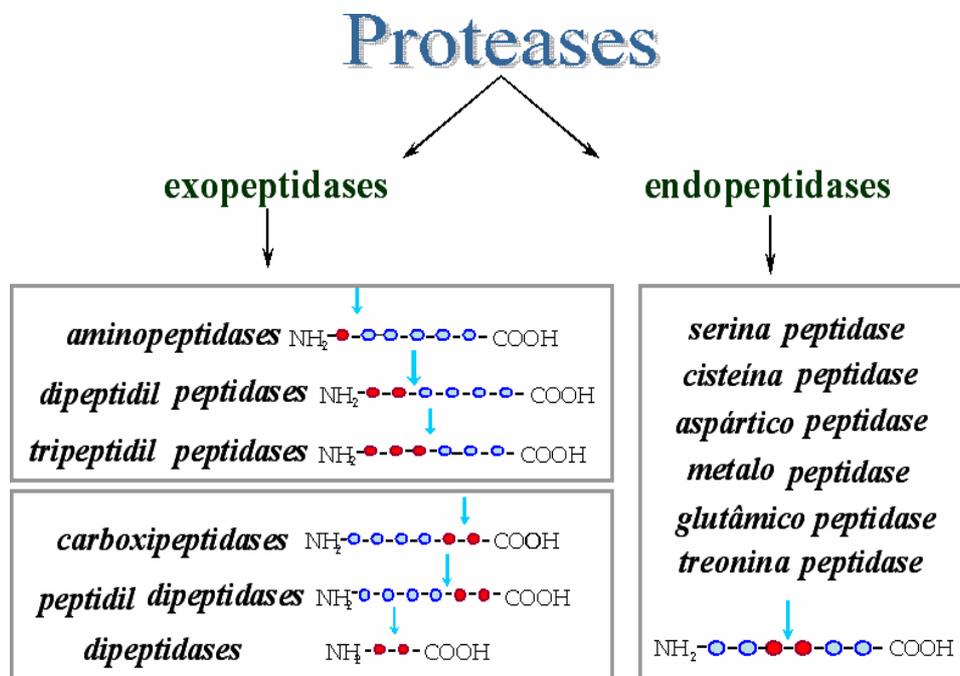


Figura 6: Esquema da classificação das peptidases quanto ao tipo de reação catalisada e a natureza química do sítio ativo (adaptado de BOND & BUTLER, 1987).

Levando em conta o terceiro critério, a análise da sequência de aminoácidos das peptidases permite estabelecer as relações evolutivas existentes entre estas; a identificação de similaridades estruturais reflete importantes correlações entre mecanismos catalíticos e outras propriedades (BARRETT, 1994). Através dessas análises comparativas, é possível determinar semelhanças funcionais e estruturais entre peptidases desconhecidas e outras bem caracterizadas.

Além dos critérios principais supracitados, as peptidases podem ter sua classificação baseada em suas propriedades físico-químicas, como: pH ótimo de atividade (peptidases ácidas, neutras ou alcalinas), sensibilidade a inibidores proteolíticos, modulação por íons metais e capacidade de degradar proteínas específicas (Ex: elastase → degradação de elastina / colagenase → degradação de colágeno). Vale a ressalva de que a classificação mais satisfatória tem como base os importantes grupamentos químicos presentes no sítio ativo da enzima proteolítica (ROOSE & VAN NOORDEN, 1995; RAO *et al.*, 1998; BARRETT, RAWLINGS & O'BRIEN, 2001).

A classificação e a nomenclatura das peptidases podem ser encontradas na base de dados "MEROPS". Esta base de dados indica a classificação de uma enzima proteolítica com base na sua estrutura e perfil de inibição. Sendo assim, as peptidases são agrupadas em famílias com base na homologia da sequência de aminoácidos. Para que uma peptidase seja alocada em determinada família, esta deve apresentar similaridade com a sequência de aminoácidos da unidade de peptidase (parte da enzima responsável pela atividade de hidrolase) da enzima representativa daquela família. Cada família de peptidase é representada por uma letra, que indica o tipo de catálise realizada, e um número é adicionado sequencialmente. Famílias que apresentam origens evolutivas relacionadas são organizadas em clãs, classificação realizada de acordo com a estrutura das enzimas que compõem tais famílias. O clã é representado por duas letras: a primeira indica o tipo de mecanismo catalítico e a segunda é adicionada sequencialmente. As letras usadas são 'A' (aspártico), 'C' (cisteína), 'M' (metalo), 'S' (serina), 'T' (treonina) ou 'U' (tipo desconhecido) (RAWLINGS & BARRETT, 2000; BARRETT, RAWLINGS & O'BRIEN, 2001, RAWLINGS *et al.*, 2002, 2004a e 2004b; BARRETT, TOLLE & RAWLINGS, 2003).

De modo significativo, enzimas pertencentes a esta classe de moléculas (a classe das peptidases) regulam a maioria dos processos fisiológicos nos diferentes organismos, regulação esta que se dá por meio do controle da ativação, da síntese e da circulação de todas as proteínas. Fatores genéticos e ambientais podem vir a desestabilizar o balanço dos fatores fisiológicos regulados pelas peptidases e isso pode culminar com o desenvolvimento de características anormais, com a ocorrência da debilidade da saúde do organismo e até mesmo com o desenvolvimento de doenças, podendo estes processos culminarem em morte. Por outro lado, as peptidases são também essenciais para a replicação/transmissão e para o sucesso do processo infeccioso de vírus, bactérias, fungos e outros

microrganismos patogênicos causadores de doenças em humanos e outros mamíferos (ABBENANTE & FAIRLIE, 2005). Em consequência, é correto afirmar que as peptidases são moléculas reguladoras de inúmeros processos que acontecem desde o nascimento até a morte de um organismo, dentre os quais: metabolismo protéico, remodelação tecidual, regulação do ciclo celular, proliferação, diferenciação e morte celular. As peptidases participam ativamente dos processos infecciosos causados pelos diferentes microrganismos, participando neste caso de eventos como: adesão, invasão, nutrição, escape, proliferação e diferenciação celular, (MCKERROW, 1989; RAO *et al.*, 1998; HUBE, 2000; HOOPER, 2002; MONOD *et al.*, 2002; DASH *et al.*, 2003; ABBENANTE & FAIRLIE, 2005; VERMELHO *et al.*, 2007).

Assim, com base na importância das peptidases nos estados de saúde e doença, bem como na patogênese microbiana, seu estudo como alvo em potencial de novas substâncias com fins terapêuticos foi proposto e, nesse âmbito, os inibidores proteolíticos têm surgido como moléculas promissoras (MCKERROW *et al.*, 1993; ABAD-ZAPATERO *et al.*, 1996; PORTER & SCULLY, 1998; HUBE, 2000; MUNRO & HUBE, 2002; ABBENANTE & FAIRLIE, 2005; VERMELHO *et al.*, 2007).

Inibidores proteolíticos são moléculas que, por meio de sua ligação às peptidases, atuam impedindo a atividade hidrolítica destas enzimas. A inibição da atividade proteolítica pode ocorrer por meio de dois mecanismos: reações reversíveis (ou “reversible tight-binding reactions”) e reações irreversíveis (ou “irreversible trapping reactions”) (RAWLINGS *et al.*, 2004). No primeiro caso há a ligação direta do inibidor ao sítio ativo da enzima; sendo esta uma reação reversível, é possível que o inibidor venha a dissociar-se do sítio catalítico da peptidase podendo, após a dissociação, o inibidor se apresentar tal qual antes da ligação à enzima ou tendo sofrido alguma modificação por ação da enzima. Caso tenha sido mantido íntegro, o inibidor poderá participar de novas reações. No caso das peptidases, após a dissociação do inibidor de seu sítio ativo, estas também estarão aptas a atuar em novas reações enzimáticas. No segundo caso, os inibidores atuam alterando a conformação da enzima, evento que se dá pela permanência do inibidor covalentemente ligado a esta; neste caso nem o inibidor e nem a enzima podem participar de novas reações (FEAR, KOMARNYTSKY & RASKIN, 2007).

Os inibidores proteolíticos podem ser agrupados e classificados de acordo com diversos critérios, os quais incluem estrutura da molécula, especificidade e origem. De acordo com o primeiro critério os inibidores podem ser alocados em dois grandes grupos: o grupo dos inibidores peptidomiméticos de baixa massa molecular e das proteínas inibidoras de peptidases, sendo este arranjo baseado em sua dicotomia estrutural (FEAR, KOMARNYTSKY & RASKIN, 2007). Levando em conta o segundo critério, os inibidores podem ser também agrupados de acordo com sua especificidade, havendo aqueles que reagem com mais de uma classe de peptidase, os que são específicos para uma única classe e aqueles que possuem elevada especificidade por uma única peptidase (BEYNON & BOND,

1989). Por fim, considerando-se o terceiro e último critério, os inibidores proteolíticos podem ser divididos em inibidores naturais e sintéticos de acordo, obviamente, com a origem da molécula. Os naturais possuem funções importantes na regulação pós-traducional da atividade proteolítica em microrganismos e em seus hospedeiros (LUSTIGMAN *et al.*, 1992). Os inibidores sintéticos, por sua vez, são utilizados como importantes ferramentas na subclassificação das peptidases em seus quatro principais grupos (serina, cisteína, metalo e aspártico peptidases) (BARRETT, 1996).

Na prática, como agentes terapêuticos, os inibidores proteolíticos vêm sendo pesquisados e/ou aplicados no tratamento de diferentes processos patológicos, os quais incluem: cânceres (SHAW *et al.*, 1990; CRAIK *et al.*, 1995; DE VIZCAYA-RUIZ *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2002), desordens inflamatórias e respiratórias (TANAKA *et al.*, 1995; FATH *et al.*, 1998), disfunções cardiovasculares (como a hipertensão arterial) (KLEINERT *et al.*, 1992; HOOVER *et al.*, 1995; SIMONEAU *et al.*, 1999) e neurodegenerativas (por exemplo, mal de Alzheimer) (VASSAR *et al.*, 1999; HONG *et al.*, 2002; TRINCHESE *et al.*, 2008; TOMITA *et al.*, 2009) (**Tabela 1**).

Foram demonstrados também, efeitos benéficos dos inibidores proteolíticos em doenças de origem microbiana. Efeitos desta natureza foram observados em tripanossomíases (CAZZULO, STOKA & TURK, 2002; VERMELHO *et al.*, 2007; TRUDEL *et al.*, 2008), em infecções virais como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (DARKE & HUFF, 1994; DASH *et al.*, 2003) e o herpes (GIBSON & HALL, 1997) e até mesmo em infecções fúngicas importantes como a candidíase, a criptococose (ABAD-ZAPATERO *et al.*, 1996; KORTING *et al.*, 1999; GRUBER *et al.*, 1999; MATA-ESSAYAG *et al.*, 2000; BERKTIÉ *et al.*, 2001; DE BERNARDIS, SULLIVAN & CASSONE, 2001; VAN BURIK & MAGEE, 2001; BLASI *et al.*, 2004; CASOLARI *et al.*, 2004; MONARI *et al.*, 2005) e a cromoblastomicose (PALMEIRA *et al.*, 2006, 2008). No entanto, sem sombra de dúvidas, dentre os muitos exemplos citados, o exemplo mais notável da aplicação de inibidores proteolíticos no tratamento de doenças infecciosas é o caso da introdução dos inibidores de aspártico peptidases do HIV (IP-HIV) utilizados no tratamento da AIDS (HO *et al.*, 1995).

Tabela 1: Exemplos de inibidores proteolíticos como quimioterápicos aplicados ou em potencial.

Protease Alvo	Função	Doença	Inibidor e Fase Teste
Protease do HIV 1	Replicação viral	AIDS	Crixivan; disponível
Renina	Geração de angiotensina I	Hipertensão	Pré-clínica
Trombina	Coagulação sanguínea	AVC, coágulo sanguíneo, infarto do miocárdio	Argatroban; fase III
Elastase de neutrófilo humano	Clivagem de elastina durante a fagocitose	Inflamação, doença pulmonar	L-658,758; fase I
Triptases	Fagocitose	Asma	APC366; fase II
C5/C3 convertases	Ativação do sistema complemento	Inflamação	FUT-187; fase II
Catepsina K	Reabsorção óssea	Osteoporose	APC 3328; pré-clínica
Protease 3C de Rinovírus	Replicação viral	Gripe comum	AG7088; pré-clínica
Enzima conversora de angiotensina	Geração de angiotensina II	Hipertensão	Trandolapril, enalapril, captopril; disponível
Metalopeptidases de matriz extracelular	Reconstrução da matriz extracelular	Inflamação, câncer, distrofia muscular	Marimistat; fase III
Enzima conversora de TNF- α	Liberação de TNF- α	Artrite, esclerose múltipla	Pré-clínica

Adaptado de LEUNG, ABBENANTE & FAIRLIE, 2000

Outros compostos que demonstram ter um potencial terapêutico contra infecções microbianas são os agentes quelantes. Muitos desses agentes quelantes são potentes inibidores de metalopeptidases, porém podem afetar também outros processos vitais, uma vez que têm a capacidade de sequestrar íons essenciais para a atividade de várias enzimas existentes em uma célula, não apenas as metalopeptidases. Por exemplo, o EDTA é conhecido por ter atividade contra a formação de biofilmes de bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (RAAD *et al.*, 2002). Além disso, o EGTA e a 1,10-fenantrolina demonstraram efeito bactericida contra *Streptococcus* do grupo B e também se mostraram eficazes em inibir a interação desta bactéria com células hospedeiras (SOARES *et al.*, 2008).

Compostos complexados com metais de transição são utilizados na clínica no combate ao câncer já há algum tempo. Podemos citar como exemplo a cisplatina, que é uma droga muito utilizada no combate ao câncer de testículo e apresenta índices de 70 a 90% de cura (MANSANO *et al.*, 2002).

Entretanto, vários estudos têm demonstrado que inibidores de peptidases complexados com metais de transição vêm surgindo como uma nova alternativa no combate às infecções fúngicas (MCCANN *et al.*, 2000; COYLE *et al.*, 2003; MCCANN *et al.*, 2004; ESHWIKA *et al.*, 2004). MCCANN e colaboradores (2004) sintetizaram a partir de 1,10-fenantrolina, um quelante de zinco e conhecido inibidor de metalopeptidases, três novos compostos: 1,10-fenantrolina-5,6-dione (fendio), $Ag(fendio)_2]ClO_4$ (Ag^{2+} -fendio) e $[Cu(fendio)_3](ClO_4)_2 \cdot 4H_2O$ (Cu^{2+} -fendio). Neste estudo foi observado que os compostos derivados de 1,10-fenantrolina são mais eficazes em matar *C. albicans* do que a 1,10-fenantrolina, inibindo o crescimento das leveduras em 95% na concentração de 5 µg/ml. Foi também descrito que o uso de fendio ou Ag^{2+} -fendio provocou alterações drásticas na morfologia das leveduras (MCCANN *et al.*, 2004). Estudos sequenciais mostraram que Cu^{2+} -fendio e Ag^{2+} -fendio alteraram a susceptibilidade das leveduras ao miconazol e a anfotericina B (ESHWIKA *et al.*, 2004). Leveduras crescidas em concentrações subinibitórias do Cu^{2+} -fendio apresentaram uma diminuição na susceptibilidade ao miconazol e à anfotericina B, enquanto que as leveduras crescidas em concentrações subinibitórias de Ag^{2+} -fendio se mostraram mais susceptíveis à ação dos antifúngicos. O tratamento das leveduras com o derivado Cu^{2+} -fendio reduziu o consumo de oxigênio pelas leveduras, mas exacerbou esse processo nas células tratadas com o derivado Ag^{2+} -fendio. Finalmente, o derivado Cu^{2+} -fendio causou redução na síntese de ergosterol pelas leveduras, enquanto o tratamento com o derivado Ag^{2+} -fendio causou efeito oposto (ESHWIKA *et al.*, 2004).

1.6) Secreção de moléculas em fungos e sua importância na interação com o hospedeiro

A secreção de moléculas por fungos tem um papel importantíssimo na biologia celular do organismo, seja para nutrição ou para disseminação no caso de fungos patogênicos. Muitas dessas moléculas secretadas são proteínas e/ou enzimas que têm recebido atenção da comunidade científica, pois muitas delas têm potencial para serem utilizadas em processos industriais e outras são fatores de virulência, que podem ser alvos para o desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados em quimioterapias alternativas (KARKOWSKA-KULETA, RAPALA-KOZIK & KOZIK, 2009).

Em geral, a produção de enzimas hidrolíticas auxilia os microrganismos nos processos infecciosos invasivos por meio da geração de danos teciduais e às membranas celulares hospedeiras, o que pode culminar com a transposição da membrana basal e a consequente disseminação microbiana (VAN BURIK & MAGEE, 2001; SCHALLER *et al.*, 2005). Em sua maioria, as barreiras estruturais do hospedeiro são compostas por proteínas. Além disso, as enzimas proteolíticas também participam de outros mecanismos associados à virulência dos patógenos, como a eliminação e/ou escape de

mecanismos de defesa do sistema imune do hospedeiro (por exemplo, através da degradação de imunoglobulinas, componentes do sistema complemento e peptídeos antimicrobianos) e a obtenção de nutrientes necessários ao desenvolvimento microbiano e a sobrevivência no tecido (HUBE, 2000; NAGLIK *et al.*, 2003). Neste contexto, diversas hidrolases secretadas já foram descritas para vários patógenos fúngicos, dentre as quais: fosfolipase B (PLB) em *C. neoformans* (SANTANGELO *et al.*, 2004; GANENDREN *et al.*, 2006), uma serina-tiol peptidase em *P. brasiliensis* (VICENTINI *et al.*, 1994); catalase B e superóxido dismutase em *H. capsulatum* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008); uma metalopeptidase em *Coccidioides posadasii* (HUNG *et al.*, 2005); β -galactosidase e α -amilase em *A. oryzae* (ODA *et al.*, 2006); aspártico peptidases em *A. fumigatus* (aspergilopepsina F e CtsD) (LEE & KOLATTUKUDI, 1995; VICKERS *et al.*, 2007), *P. brasiliensis* (TACCO *et al.*, 2009), *C. neoformans* (PINTI *et al.*, 2007) e *Candida albicans* (SANGLARD *et al.*, 1997; HUBE, 2000; NAGLIK *et al.*, 2003; ALBRECHT *et al.*, 2005; SCHALLER *et al.*, 2005).

De modo mais detalhado, com o objetivo de ressaltar a importância das peptidases secretadas na interação entre o microrganismo invasor e o hospedeiro, podemos citar a produção de serina e metalopeptidases secretadas por *C. neoformans* (RODRIGUES *et al.*, 2003; EIGENHEER *et al.*, 2007) e de aspártico peptidases em *Fonsecaea pedrosoi* (PALMEIRA *et al.*, 2006; 2008) e em *C. albicans* (SANGLARD *et al.*, 1997; HUBE, 2000; NAGLIK *et al.*, 2003; SCHALLER *et al.*, 2005; ALBRECHT *et al.*, 2006). No que diz respeito à *C. neoformans*, RODRIGUES e colaboradores (2003), inicialmente, demonstraram a ocorrência de proteínas ligadoras de fibronectina neste patógeno fúngico. Diversas análises subsequentes demonstraram, no entanto, que esta ligação ocorria de forma reduzida, o que sugeriu uma baixa capacidade do fungo de se ligar à referida molécula. Ratificando estes achados foi descrita a presença de uma atividade de serina peptidase no sobrenadante de cultivo de *C. neoformans*, que se mostrou capaz de clivar fibronectina, bem como laminina e colágeno. Esses resultados sugeriam que *C. neoformans* poderia produzir enzimas extracelulares, as quais seriam capazes de auxiliar nos processos infecciosos invasivos pela degradação da membrana basal e/ou de componentes de matriz extracelular do hospedeiro (RODRIGUES *et al.*, 2003). Análises proteômicas de moléculas secretadas (secretoma) realizadas por EIGENHEER e colaboradores (2007) revelaram, dentre outras moléculas, a presença de uma metalopeptidase que se apresentava estruturalmente similar a uma enzima desta mesma natureza produzida por *A. fumigatus*, possuindo esta última atividade elastinolítica (EIGENHEER *et al.*, 2007). Esta metalopeptidase de *C. neoformans* poderia ser uma enzima adicional que também auxiliaria o fungo na transposição das barreiras estruturais do hospedeiro.

Em *F. pedrosoi*, a atividade de aspártico peptidases secretadas foi identificada durante o crescimento tanto de formas micelianas quanto de conídios do fungo em meio quimicamente definido. Estas enzimas foram completamente inibidas por pepstatina A, um potente inibidor desta classe de

peptidases. As enzimas secretadas possuíam parâmetros bioquímicos distintos, como exemplo pH ótimo, sugerindo a presença de isoformas distintas; no entanto, degradavam soroalbumina bovina (BSA), albumina humana (HSA), fibrinogênio, fibronectina, laminina e colágeno tipo I, o que sugere a participação destas enzimas em processos de invasão e disseminação nos tecidos hospedeiros (PALMEIRA *et al.*, 2005, 2006).

C. albicans é um microrganismo que tem sua atividade proteolítica majoritariamente atribuída às Saps; estas são aspártico peptidases secretadas resultantes da expressão de uma família multigênica que possui 10 membros (SAPs 1-10). As Saps de 1 a 8 são secretadas para o meio extracelular, ao contrário das Saps 9 e 10 que permanecem ancoradas à membrana via uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (SCHALLER *et al.*, 2005; ALBRECHT *et al.*, 2006). As Saps estão associadas ao processo infeccioso, uma vez que a deleção dos genes referentes às Saps 1, 2 e 3 individualmente, assim como a deleção dos genes correspondentes às Saps de 4 a 6, observou-se a perda da virulência fúngica (SANGLARD *et al.*, 1997; HUBE, 2000). ALBRECHT e colaboradores (2006) demonstraram, por meio da utilização de cepas mutantes, que ao contrário das demais enzimas da família, as Saps 9 e 10 parecem possuir papel mais relevante na integridade da superfície celular e na separação das células filhas durante o brotamento do que no processo patológico propriamente dito. Apesar da maioria dos estudos relacionados a peptidases em *Candida* terem como alvo as Saps, COSTA e colaboradores (2003) descreveram pela primeira vez que estas leveduras eram capazes de produzir e secretar para o meio extracelular metalo e serina peptidases quando cultivadas em meio complexo. SANTOS & SOARES (2005) demonstraram que uma espécie de *Candida* não-*albicans*, *C. guilliermondii*, isolada de um indivíduo soropositivo para o HIV, era capaz de secretar uma serina peptidase de 50 kDa com capacidade de hidrolisar proteínas presentes no soro humano e componentes da matriz extracelular. SANTOS e colaboradores (2006) descreveram que cepas clínicas de *C. albicans* também secretavam uma serina peptidase de 50 kDa com amplo espectro de degradação sobre diferentes substratos protéicos. Um estudo mais recente, realizado com *C. lipolytica* e *C. rugosa*, isoladas do sangue de pacientes com leucemia e anemia falciforme, respectivamente, demonstrou a ocorrência de serina e metalopeptidases, cuja detecção variou de acordo com o meio de cultivo utilizado (DE MELO *et al.*, 2007).

O conhecimento sobre a secreção de moléculas, bem como sobre suas funções e implicações, é limitado em *Pseudallescheria/Scedosporium*. A literatura envolvendo a detecção e caracterização de moléculas desta natureza produzidas por este patógeno fúngico contempla, sobretudo, as enzimas hidrolíticas pertencentes à classe das peptidases.

As primeiras evidências da expressão de peptidases no complexo *Pseudallescheria/Scedosporium* foram geradas por LARCHER e colaboradores (1996), que isolaram uma serina peptidase secretada por *S.*

apiospermum com massa molecular aparente de 33 kDa e pI 9,3. Essa enzima apresentou atividade ótima em pH 9,0 a 37°C e capacidade de hidrolisar fibrinogênio humano, o que sugeria sua ação como mediador de inflamações broncopulmonares crônicas. Estes resultados são similares aos previamente descritos para uma peptidase secretada por *A. fumigatus* isolado de pacientes com fibrose cística (LARCHER *et al.*, 1992).

Nosso grupo descreveu uma nova classe de peptidase secretada por formas micelianas de *P. boydii* (SILVA *et al.*, 2006). Os resultados mostraram que formas de micélio de *P. boydii* foram capazes de secretar uma peptidase de 28 kDa durante treze dias de cultivo em meio Sabouraud, sendo a máxima produção enzimática detectada no sétimo dia de cultivo. A peptidase encontrada mostrou-se ativa em pH ácido e teve sua atividade completamente inibida por 1,10-fenantrolina, um conhecido inibidor de zinco-metalopeptidases. Esses resultados foram estendidos através de análises que incluíram a modificação das condições de cultivo para a secreção de peptidases, uma vez que mudanças nos parâmetros de crescimento poderiam afetar a expressão e/ou produção destas enzimas (PALMEIRA *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2006). Em ensaios de secreção em PBS suplementado com glucose (SILVA *et al.*, 2006b), observamos que polipeptídeos de 28 e 35 kDa apresentaram atividade proteolítica em pH ácido (5,5) susceptíveis à inibição por 1,10-fenantrolina. Na ausência de metais divalentes, as duas enzimas proteolíticas eram incapazes de promover a degradação de substrato protéico. No entanto, após a suplementação de metais como cobre, zinco, magnésio, manganês e cálcio obtinha-se a restituição das atividades enzimáticas (SILVA *et al.*, 2006b). Ambas as metalopeptidases (28 e 35 kDa) foram capazes de degradar diferentes substratos protéicos, incluindo proteínas séricas (albumina, hemoglobina e IgG) e componentes de matriz extracelular (fibronectina e laminina). Esses dados sugeriam uma função para estas enzimas no escape da resposta imune do hospedeiro e/ou nas etapas de disseminação do fungo (SILVA *et al.*, 2006b).

É sabido que enzimas hidrolíticas possuem também papel essencial na biologia celular dos fungos, incluindo regulação do ciclo celular, nutrição, diferenciação e crescimento celular (SCHALLER *et al.*, 2005). Nesse sentido, é de grande relevância o estudo do possível papel das peptidases como ferramentas importantes na biologia celular do *P. boydii* bem como, a possível aplicação de inibidores proteolíticos como tentativa de tratamento para infecções causadas por essa espécie.

Objetivos

2) OBJETIVOS:

2.1) Objetivos gerais:

Usando *P. boydii* como modelo, são nossos objetivos:

2.1.1. Investigar o efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre crescimento, morfologia, expressão de moléculas de superfície, formação de biofilme, atividade de metalopeptidase secretada e eficiência de interação com células hospedeiras, bem como avaliar o efeito citotóxico destes compostos sobre células animais *in vitro* e *in vivo*.

2.1.2. Identificar por abordagem proteômica as moléculas secretadas por este fungo.

2.2) Objetivos específicos:

PARTE I: Avaliação do efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados em eventos da biologia de *P. boydii*:

- Estudar a influência de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre: a viabilidade celular, a diferenciação celular, a capacidade do fungo em aderir à superfície abiótica, a expressão de moléculas de superfície, a atividade de metalopeptidase secretada e a interação com células de mamíferos;
- Avaliar o efeito antifúngico sinérgico de 1,10-fenantrolina e seus derivados com antifúngicos utilizados na clínica;
- Avaliar a citotoxicidade de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre diferentes linhagens celulares e em camundongos suíços albinos.

PARTE II: Detectar a presença de moléculas ligadoras de fibronectina em *P. boydii*:

- Avaliar a presença de moléculas ligadoras de fibronectina em *P. boydii*, através de citometria de fluxo, imunoblotting e técnicas microscópicas;
- Avaliar a importância destas moléculas na interação de *P. boydii* com células de mamíferos.

PARTE III: Análise proteômica de moléculas secretadas por formas micelianas de *P. boydii*:

- Identificar as proteínas secretadas por *P. boydii*, através de gel 2D e sequenciamento por espectrometria de massas.

Material e Métodos

3) MATERIAL E MÉTODOS

► PARTE I: Avaliação do efeito de 1,10-fenantrolina e de seus derivados em eventos da biologia de *P. boydii*:

3.1) Microrganismos e condições de cultivo:

No presente trabalho foi utilizado o fungo *Pseudallescheria boydii*, cepa HLPb. Esta cepa foi cedida pelo Dr. Bodo Wanke, do Hospital Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Este fungo foi isolado de um paciente portador de micetoma micótico. A cultura foi mantida em tubos de rosca contendo 5 ml de meio Sabouraud-modificado sólido inclinado (2% de glucose, 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 1,5% de ágar) através de repiques mensais e incubação à temperatura ambiente (PINTO *et al.*, 2001).

3.2) Obtenção do micélio:

Após o crescimento em meio sólido, as células foram inoculadas em Erlenmeyers de 500 ml contendo 200 ml de meio Sabouraud-modificado líquido. Após incubação à temperatura ambiente durante 7 dias, sob agitação, o micélio foi obtido por filtração a vácuo, em funil Büchner e lavado com PBS (NaCl 150 mM; tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,2).

3.3) Obtenção dos conídios:

Os conídios foram obtidos em placa de Petri contendo meio Sabouraud-modificado após 7 dias de cultivo à temperatura ambiente. Após este período, as suspensões de conídios foram obtidas através da raspagem das placas de Petri utilizando-se 5 ml de PBS estéril, pH 7,2. O material foi filtrado em gaze e lavado três vezes com PBS por centrifugação (6000 rpm, 10 min). O número de conídios, em cada preparação obtida, foi determinado por contagem em câmara hematocitométrica de Neubauer (PINTO *et al.*, 2001).

3.4) Obtenção dos extratos celulares:

Após filtração em papel de filtro (Whatman 1), aproximadamente 1 g (peso úmido) de massa celular de micélio foi ressuspenso em 1 ml de tampão de lise (PBS 10 mM, pH 7,2; 1% Triton X-100). A essa mistura foi adicionada, aproximadamente 1 g de pérolas de vidro e, em homogeneizador mecânico

de células, foram realizados 15 ciclos de 2 min, alternados com banhos de gelo. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 12000 rpm por 6 min e o sobrenadante foi chamado de extrato celular de micélio. O mesmo procedimento descrito acima foi realizado com os conídios (1×10^8 células) de *P. boydii*.

3.5) Obtenção do sobrenadante PBS condicionado:

O micélio de *P. boydii* foi colhido por filtração após 7 dias de crescimento, lavado 3 vezes com PBS e ressuspenso em 1000 ml de PBS suplementado com 2% de glucose (todo procedimento foi realizado assepticamente). As células micelianas foram então incubadas por 20 h à temperatura ambiente sob agitação constante. Depois deste período, as células foram removidas por filtração e o PBS condicionado foi filtrado em membrana Millipore 0,22 μ m. O volume de 1000 ml foi submetido à concentração através de sistema AMICON (AMICON, Beverly, USA), com membrana de exclusão ("cut-off") igual a 10 kDa em banho de gelo. O PBS condicionado foi concentrado aproximadamente 100 vezes (SILVA *et al.* 2006). Esse procedimento para obtenção do PBS condicionado foi repetido 4 vezes e todos os sobrenadantes concentrados foram associados e chamados de sobrenadante final (SF). O SF foi utilizado em todas as etapas deste estudo.

3.6) Quantificação química de proteínas:

As proteínas foram quantificadas de acordo com o método descrito por LOWRY e colaboradores (1951), utilizando-se soro albumina bovina (BSA) como solução padrão.

3.7) Dosagem química da atividade proteolítica:

Para quantificar a atividade proteolítica, o correspondente a 40 μ g de proteína dos extratos celulares e do PBS condicionado foram adicionados a 240 μ l de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 5,5 e a 70 μ l de uma solução de BSA a 1%. Em seguida, as misturas de reação foram incubadas por 2 h a 37°C e alíquotas de 100 μ l foram retiradas das mesmas para serem adicionadas a 100 μ l de Coomassie G-250 e 50 μ l de água. A leitura foi realizada, após 10 min de contato das misturas de reação com o corante, em espectrofotômetro (DU série 530, Beckman) a 595 nm. Para a determinação da atividade total enzimática a absorbância do controle foi subtraída da absorbância do teste. Todas as misturas de reações e os controles foram preparados em triplicatas (BUROKER-KILGORE & WANG, 1993). A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar um aumento de 0,001 unidades na absorbância. Alternativamente, este ensaio foi realizado na presença de inibidores proteolíticos. Neste

caso, as amostras foram inicialmente incubadas individualmente com cada um dos inibidores proteolíticos por 30 min à temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se o substrato.

3.8) Derivados de 1,10-fenantrolina:

Os compostos derivados de 1,10-fenantrolina (**Fig. 6**) utilizados no presente estudo foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo Dr. Malachy McCann, Professor Titular do Departamento de Química da National University of Ireland. Os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). Soluções estoques na concentração de 10 µg/ml foram preparadas e estocadas no congelador.

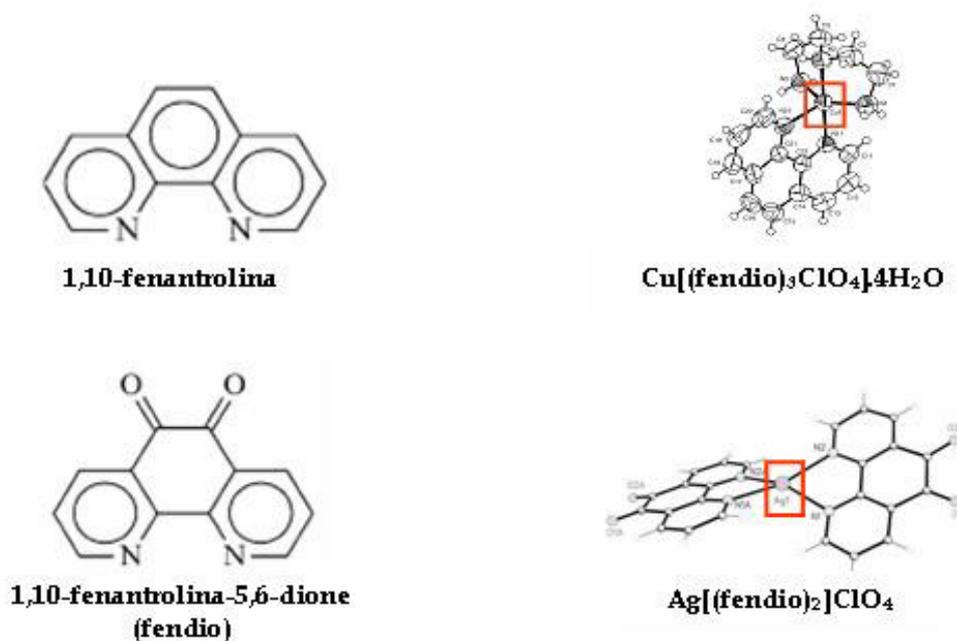


Fig 6: Estrutura química da 1,10-fenantrolina e seus derivados. Fonte: MCCANN *et al.*, 2004.

3.9) Análise da influência de 1,10-fenantrolina e seus derivados na viabilidade celular das formas conidias de *P. boydii*:

Com a finalidade de verificar o efeito destes compostos no crescimento celular de *P. boydii*, conídios (1×10^3) foram incubados na ausência ou na presença de 1,10-fenantrolina, fendio, Cu^{2+} -fendio e Ag^{2+} -fendio, em concentrações que variaram de 0,001 a 1 µg/ml por 16 h à temperatura ambiente. Dois sistemas controles foram confeccionados: em um deles, a suspensão fúngica foi incubada em meio de cultura suplementado com PBS e o segundo controle consistiu da suplementação do meio de cultura com DMSO, diluente das drogas, na maior concentração utilizada para solubilização dos compostos derivados de 1,10 fenantrolina. Após a incubação nas condições descritas acima, os conídios foram

lavados três vezes com PBS e plaqueados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud. Após 7 dias, avaliou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC).

3.10) Análise da influência de 1,10-fenantrolina e seus derivados no crescimento celular das formas micelianas de *P. boydii*:

Com a finalidade de verificar o efeito dos compostos no crescimento de micélio de *P. boydii*, conídios (1×10^3) foram incubados em placa de 96 poços contendo caldo Sabouraud por 48 h à temperatura ambiente, para a total diferenciação de conídios a micélio (SILVA *et al.*, 2009). Após o período de diferenciação foram adicionados aos poços: 1,10-fenantrolina, fendio, Cu^{2+} -fendio e Ag^{2+} -fendio, em concentrações que variaram de 0,001 a 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Os sistemas foram mantidos por 16 h à temperatura ambiente e posteriormente lavados três vezes com PBS. As células foram então inoculadas em ágar Sabouraud para contagem de UFC após 7 dias de crescimento.

3.11) Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre a diferenciação celular de *P. boydii*:

Com a finalidade de verificar o efeito dos compostos sobre o processo de diferenciação celular de *P. boydii*, 5×10^6 conídios foram incubados na ausência (controle) ou na presença de 1,10-fenantrolina e seus derivados, em diferentes concentrações (0,001 a 1 $\mu\text{g/ml}$), por 24 h à temperatura ambiente em meio Sabouraud (SILVA *et al.*, 2009). Decorrida a incubação, os sistemas foram lavados três vezes com PBS e, em seguida, analisados através de microscopia óptica para verificar a diferenciação celular (transformação de conídios a micélio) (PINTO *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2009). Como um controle de viabilidade celular, os sistemas foram também plaqueados em ágar Sabouraud para verificação do crescimento celular.

3.12) Padronização da formação de biofilme por *P. boydii* em uma superfície abiótica:

Uma vez que não estava estabelecida a capacidade de *P. boydii* de formar agregados celulares em superfícies inertes, foi realizado inicialmente um ensaio onde se variou a concentração do inóculo (10^2 a 10^7 conídios) e o tempo de incubação (24 a 72 h) para determinação de adesão a placas de poliestireno. Os conídios foram adicionados a placas de 96 poços e, após os períodos de incubação descritos acima, os poços foram lavados três vezes com PBS e incubados com o corante cristal violeta a 5% à temperatura ambiente por 5 min. Após o tempo de coloração, os sistemas foram lavados três vezes com água destilada para remoção do excesso do corante e procedeu-se a descoloração com etanol absoluto por 5

min. Posteriormente, o etanol foi transferido para outra placa de 96 poços e a absorvância mensurada a 570 nm em leitor de ELISA (RAVI *et al.*, 2008).

3.12.1. Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre a formação de biofilme por *P. boydii*:

Após a padronização escolheu-se a densidade de 10^6 conídios e o tempo de 48 h de incubação. Foram realizados três ensaios diferentes para avaliar o efeito dos compostos na formação do biofilme de *P. boydii*. Em todos os ensaios, os compostos foram utilizados na concentração subinibitória de 0,1 $\mu\text{g/ml}$. No primeiro, 10^6 conídios foram pré-tratados com 1,10-fenantrolina e seus derivados por 20 h e, depois, os sistemas foram adicionados em placas de 96 poços. No segundo ensaio, os conídios foram incubados com 1,10-fenantrolina e seus derivados durante todo o tempo de formação do biofilme (48 h). No terceiro ensaio, após 48 h de formação do biofilme, 1,10-fenantrolina e seus derivados foram adicionados aos sistemas por 20 h adicionais. Após os períodos de incubação citados acima, procedeu-se a coloração com cristal violeta e posterior leitura como descrito no item anterior.

3.13) Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados na interação de conídios de *P. boydii* com macrófagos peritoneais de camundongo:

3.13.1. Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongo:

Os camundongos foram, inicialmente, estimulados (por injeção intraperitoneal) com solução de tioglicolato de sódio a 3%. Após 72 h, os animais foram mortos em câmara de CO_2 e meio de cultivo RPMI gelado foi injetado na região intraperitoneal. O RPMI injetado foi recuperado por punção intraperitoneal e o volume obtido foi centrifugado. O sedimento, correspondente às células, foi ressuspensão em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e, em seguida, adicionado a placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. A placa foi incubada por um período de 30 min a 37°C em atmosfera de CO_2 . Após a incubação foram realizadas três lavagens para remoção das células não aderidas e foi feita a contagem do número de células por poço em microscópio invertido. A placa com as células foi, então, novamente incubada a 37°C em atmosfera de CO_2 por 24h. Decorrido este tempo, procederam-se os ensaios de interação.

3.13.2) Ensaios de interação entre conídios de *P. boydii* e macrófagos:

Com a finalidade de verificar o efeito dos inibidores de metalopeptidases sobre a interação fúngica com os macrófagos, suspensões de 1×10^6 conídios/ml, em meio Sabouraud, foram incubados à temperatura ambiente por 1 h na ausência (controle) ou na presença de 1,10-fenantrolina e seus derivados em concentrações sub-inibitórias (0,1 µg/ml). Os sistemas foram lavados três vezes com PBS e colocados para interagir com os macrófagos pelo período de 1 h (PINTO *et al.*, 2001). Em seguida, os sistemas foram lavados com PBS e as lamínulas contendo a interação foram fixadas com Bouin por 10 min, lavadas com álcool, para retirada do excesso do Bouin, lavadas exaustivamente com água destilada e coradas com Giemsa por 90 min, seguindo bateria de acetona/xilol. Após coloração, foi determinado o índice de associação dos conídios às células animais [% de células animais com fungos aderidos e/ou internalizados \times (número de fungos aderidos/internalizados dividido pelo número de células animais com fungos aderidos/internalizados)].

3.14) Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados na interação de conídios de *P. boydii* com fibroblastos de pulmão humano (MRC-5) e células do epitélio pulmonar do tipo 2 (A549) :

3.14.1. Cultivo das células pulmonares:

As células MRC-5 e A549 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e glutamina 2 mM a 37°C e 5% de CO₂. Para os experimentos de interação com fungos, as células foram plaqueadas na densidade 1×10^5 células por poço, em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro.

3.14.2) Ensaios de interação entre conídios de *P. boydii* e linhagens pulmonares:

Com a finalidade de verificar o efeito dos inibidores de metalopeptidases sobre a interação fúngica com as células pulmonares, suspensões de 1×10^6 conídios/ml, em meio Sabouraud, foram incubados à temperatura ambiente por 1 h na ausência (controle) ou na presença de 1,10-fenantrolina e seus derivados em concentrações sub-inibitórias (0,1 µg/ml). Os sistemas foram lavados três vezes com PBS e colocados para interagir com as células animais pelo período de 2 h. Em seguida, os sistemas foram lavados com PBS e as lamínulas contendo a

interação foram fixadas com Bouin por 10 min, lavadas com álcool, para retirada do excesso do Bouin, lavadas exaustivamente com água destilada e coradas com Giemsa por 90 min, seguindo bateria de acetona/xilol. Após coloração, foi determinado o índice de associação dos conídios às células animais.

3.15) Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados no tratamento de sistemas celulares após interação entre conídios de *P. boydii* e macrófagos peritoneais de camundongo:

Suspensões de 1×10^6 conídios em DMEM foram adicionadas a placas de 24 poços revestidas por macrófagos peritoneais de camundongo. Depois de 2 h de interação celular, os sistemas foram lavados com meio DMEM para remoção dos conídios não aderidos. Os sistemas foram então tratados com a 1,10-fenantrolina e seus derivados na concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ por 2h. Após o tratamento, os macrófagos foram lisados com água gelada e os extratos celulares foram diluídos 1000 vezes e plaqueados em meio Sabouraud para posterior contagem de UFC (PALMEIRA *et al.*, 2008).

3.16) Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados na expressão de moléculas de superfície de *P. boydii*:

Os conídios (5×10^6) foram incubados na ausência ou na presença de 1,10-fenantrolina e seus derivados como descrito no item 3.7 desta sessão. Os sistemas foram lavados três vezes com PBS e incubados com a lectina Concanavalina A (Con A) conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$ à temperatura ambiente por 1 h. Alternativamente, após o tratamento com os compostos inibidores de metalopeptidases, os conídios foram também incubados com 200 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina solúvel por 1 h e posterior incubação com anticorpo primário anti-fibronectina (Sigma) na diluição 1:100 também por 1 h. Os conídios foram alternativamente incubados com anticorpo anti-PRM na concentração 25 $\mu\text{g/ml}$ à temperatura ambiente por 1 h. Os sistemas foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário IgG de coelho conjugado a FITC (Sigma) na diluição de 1:400 à temperatura ambiente por 1 h. Por fim, as células foram submetidas à nova lavagem e, então, examinadas no citômetro de fluxo (FACS). Após a leitura, o material restante foi centrifugado e as células recuperadas foram utilizadas para observação em microscopia de fluorescência. Nesse sentido, as células foram utilizadas para montar sistemas entre lâminas e lamínulas na presença de *n*-propilgalato.

3.17) Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados na ultraestrutura de conídios de *P. boydii*:

Conídios (1×10^6) foram tratados ou não com 1,10-fenantrolina e seus derivados na concentração de 1 µg/ml por 16 h à temperatura ambiente. Posteriormente os sistemas foram lavados e adicionados a placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro e incubados por 16 h a temperatura ambiente em PBS. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas em 0,15 M de tampão cacodilato de cálcio contendo 2% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído, pH 7,4, por 16 h. Após a etapa de fixação, as amostras foram lavadas três vezes com 0,15 M de tampão cacodilato de sódio. A etapa de pós-fixação foi realizada por 90 min em 1 % de ósmio em 0,15 M de tampão cacodilato de sódio. Posteriormente procederam-se as lavagens, como descrito acima, e as amostras foram desidratadas em uma série ascendente de etanol (50, 70, 80, 95 e 100%) por 10 min cada. Em seguida, as amostras foram levadas ao ponto crítico, metalizadas com ouro coloidal e, finalmente, observadas em microscópio eletrônico de varredura.

3.18) Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados na expressão de esterol em *P. boydii*:

Para a análise de esterol, conídios de *P. boydii* tratados ou não tratados com 1,10-fenantrolina e seus derivados como descrito no item 3.7 desta sessão, foram submetidos a sucessivas extrações com metanol-clorofórmio, de modo a promover a extração dos lipídeos da célula. O material foi centrifugado para descartar o precipitado, e levado à secura em nitrogênio. Após realização da partição de Folch (1957), para as análises da presença de esterol, o extrato lipídico foi resolvido por cromatografia em camada fina (HPTLC), utilizando como sistema solvente uma mistura de hexano-éter-ácido acético (80:40:2 vol/vol/vol) e revelado com uma solução contendo 50 mg de FeCl₃, 90 ml de água, 5 ml de ácido acético e 5 ml de ácido sulfúrico. Posteriormente, a placa foi aquecida a 100°C por 5 min e as bandas de esterol foram então visualizadas e comparadas com o padrão de ergosterol. Os volumes aplicados nas placas foram definidos de acordo com o número de células obtido em cada sistema.

3.19) Estudo do efeito sinérgico entre anfotericina B ou fluconazol com concentrações sub-inibitórias de 1,10-fenantrolina e seus derivados:

3.19.1) Efeito da anfotericina B e do fluconazol no crescimento de conídios de *P. boydii*:

Com a finalidade de verificar a susceptibilidade da cepa HLPB aos antifúngicos utilizados na clínica, 1×10^3 conídios de *P. boydii* foram incubados na ausência ou na presença de anfotericina B ou de fluconazol em diferentes concentrações (de 5 a 100 $\mu\text{g/ml}$) por 16 h à temperatura ambiente. Após a incubação, os conídios foram lavados três vezes com PBS e plaqueadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud. Após 7 dias, avaliou-se o número de UFC.

3.19.2) Estudo do efeito sinérgico:

Com a finalidade de verificar o efeito sinérgico do tratamento com os inibidores de metalopeptidases e dos antifúngicos, 1×10^3 conídios foram incubados na ausência ou na presença de 1,10-fenantrolina e seus derivados na concentração sub-inibitória de 0,001 $\mu\text{g/ml}$ juntamente com os antifúngicos (anfotericina B ou fluconazol) também em concentração sub-inibitória de 10 $\mu\text{g/ml}$ por 16 h à temperatura ambiente. Após a incubação, os conídios foram lavados três vezes com PBS e plaqueadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud. Após 7 dias, avaliou-se o número de UFC.

3.20) Determinação do CC_{50} dos inibidores para diferentes linhagens celulares:

O efeito dos inibidores de metalopeptidases na viabilidade de diferentes linhagens celulares, dentre as quais células de mamíferos (primárias ou imortalizadas) e invertebrados, foi determinado através da técnica denominada “incorporação de corante” (NEYNDORFF *et al.*, 1990) com pequenas modificações. A técnica consiste na incorporação do corante vermelho neutro pelas células vivas e sua posterior quantificação por leitura em espectrofotômetro, sendo então calculada a concentração citotóxica para 50% das culturas de células. As substâncias, em diferentes concentrações (0,001 a 10 $\mu\text{g/ml}$), foram colocadas em contato com as monocamadas de células confluentes. Em seguida, as células foram incubadas a 37°C por 24 h em ambiente contendo 5% de CO_2 , com exceção da linhagem C6/36 que foi incubada por 24 h a 28°C. Após a incubação, sem retirar o meio das microplacas, foram adicionados 100 μl de vermelho neutro (0,01%) em cada poço e as placas foram incubadas a 37°C (28°C

para a C6/36) por 3 h para penetração do corante nas células vivas. O corante foi desprezado e a monocamada de células lavada com PBS, pH 7,2, para retirar o excesso de corante não incorporado às células. Após a lavagem, foram adicionados 100 µl de solução de formaldeído a 4% em PBS por 10 min, para promover a fixação das células às placas. Em seguida, uma mistura de ácido acético a 1% com metanol a 50% foi colocada para que ocorresse o rompimento das células íntegras para liberação do corante e solubilização deste. Após 20 min, a leitura foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 492 nm. A porcentagem de células viáveis foi obtida através da comparação da média da densidade óptica (DO) do controle de células (não tratado) com as médias das DOs obtidas das células tratadas com as substâncias em diferentes concentrações, sendo calculada a toxicidade para 50% das células em cultura (CC₅₀).

3.21) Ensaio de toxicidade aguda de 1,10-fenantrolina e seus derivados em camundongos:

Os testes de toxicidade aguda foram realizados com camundongos suíços albinos (fêmeas) com peso corpóreo entre 16,4 e 28,2 g, fornecidos pelo Biotério do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes - UFRJ. Os animais foram separados em grupos de cinco animais em função do peso corpóreo, com o intuito de equalizar os efeitos por dosagem aplicada e facilitar a interpretação dos resultados. Para cada concentração de inibidor testada foram utilizados cinco camundongos, tendo sido aplicados volumes de 0,1 ml contendo os compostos em concentrações que variaram de 15 a 450 mg/Kg de peso, por meio de injeções intraperitoniais. O grupo controle não recebeu injeção e um grupo de animais recebeu injeções contendo DMSO a 10% (equivalente à maior concentração das drogas). Após as injeções, os animais foram mantidos em local arejado com ração e água, sob observação contínua durante as primeiras 5 h e, posteriormente, em intervalos de 6 a 12 h até um total de 168 h. Estes experimentos foram realizados sob a supervisão do Prof. Dr. Alexandre Pirro da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

3.22) Ensaio de toxicidade crônica de 1,10-fenantrolina e seus derivados em camundongos:

Para este ensaio foi escolhida a concentração dos inibidores equivalente a 45 mg/Kg de peso, tendo sido aplicados volumes de 0,1 ml dos compostos diluídos em DMSO. Foi realizado um controle com camundongos que não receberam nenhuma injeção e um outro controle com camundongos que só receberam injeção com o DMSO. As injeções intraperitoniais foram realizadas diariamente durante cinco dias consecutivos. Após as injeções, os animais foram mantidos em local arejado com ração e

água, sob observação contínua durante as primeiras 5 h e, posteriormente, em intervalos de 6 a 12 h até um total de 168 h. Estes experimentos foram realizados sob a supervisão do Prof. Dr. Alexandre Pirro da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

Em paralelo, os camundongos foram submetidos à coleta de sangue. As amostras de sangue foram processadas e levadas ao laboratório de análises clínicas da Faculdade de Farmácia - UFRJ, para a realização da dosagem das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (TGO) e a alanina aminotransferase (TGP), usadas como marcadores da integridade hepática.

► PARTE II: Detecção de proteínas ligadoras de fibronectina em *P. boydii*:

3.23) Determinação do perfil de proteínas presentes nos extratos celulares de micélio e conídio de *P. boydii* (item 3.4):

Para a análise do perfil de proteínas realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12%, com gel de empacotamento a 3%, de acordo com o sistema descrito por LAEMMLI (1970). As amostras foram adicionadas de 5% de β -mercaptoetanol e aquecidas, em banho-maria, por aproximadamente 5 min, a 100°C. Aos géis foram aplicados 40 μ g de proteínas referentes à amostra e a eletroforese processada a 100 V, a 4°C. As proteínas foram reveladas através da coloração dos géis com 0,2% de Coomassie brilliant blue R-250 em metanol: ácido acético:água (50:10:40 v/v/v) ou com nitrato de prata (GONÇALVES *et al.*, 1984).

3.24) Ensaios de "Western blotting":

As proteínas presentes nos extratos celulares (item 3.4) e no sobrenadante PBS condicionado (item 3.5) de *P. boydii* foram separadas por SDS-PAGE 12%, como descrito no item 3.23, e transferidos (100 V/300 mA, 2 h, 4°C) para membrana de nitrocelulose em tampão Tris-base 25 mM, contendo glicina 200 mM e 20% de metanol. Após a transferência, as membranas foram incubadas por 24 h a 4°C em tampão de bloqueio (PBS pH 7,2; Tween 20 a 0,1%, leite em pó desnatado a 5%). Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por 10 min com PBS-0,1% Tween. Estas foram então incubadas por 1 h, sob agitação, com 10 μ g/ml de fibronectina; posteriormente foram lavadas três vezes por 10

min em PBS-0,1% Tween e incubadas com anticorpo primário anti-fibronectina (sigma) na diluição de 1:1500. As membranas foram novamente lavadas três vezes por 10 min em PBS-0,1% Tween e incubadas com o anticorpo secundário (IgG-coelho) conjugado à peroxidase por 1 h à temperatura ambiente sob agitação. Após a incubação, os sistemas foram lavados três vezes por 10 min em PBS-0,1% Tween e finalmente, as membranas foram reveladas através de quimioluminescência (sistema ECL).

3.25) Ensaio de aderência de conídios de *P. boydii* à fibronectina:

Placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com 100, 200 ou 400 µg/ml de fibronectina solúvel ou 400 µg/ml de BSA solúvel e, posteriormente, incubadas por 1 h a 37°C, seguindo adicionais 20 h a 4°C em câmara úmida. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBS-Tween 0,05% (150 µl/poço). Foram adicionados a cada poço da placa 100 µl de solução contendo 1×10^6 conídios de *P. boydii*. A placa foi incubada por 1 h a 37°C, em seguida, foram realizadas 5 lavagens com PBS-Tween 0,1% - 150 µl/poço. Os sistemas foram bloqueados por incubação com PBS-Tween 0,1% contendo 5% de leite desnatado (150 µl/poço), pelo período de 1h a 37°C em câmara úmida. Os sistemas foram novamente lavados e os poços foram incubados com anticorpo primário anti-célula total de *P. boydii* produzido em coelho (PINTO *et al.*, 2000) na diluição de 1:8000 em tampão de bloqueio por 1 h em a 37°C em câmara úmida. Seguido o tempo de incubação foi realizada nova lavagem como descrito acima e após procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase diluído a 1:2000 em tampão de bloqueio como na etapa anterior. As placas foram, então, lavadas como previamente descrito e adicionadas de 100 µl do substrato enzimático [4 mg de orto-fenilenodiamina (OPD) em 10 ml de tampão citrato (pH 5,5) + 4 µl de H₂O₂ 30 V]. A reação se processa no escuro, à temperatura ambiente, e após 20 min foi interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 3 N em cada poço. A densidade óptica foi determinada por leitura no comprimento de onda a 490 nm em leitor "Thermo Plate". A BSA e a fibronectina, sem a presença dos conídios, foram utilizados como controles negativos.

3.26) Ensaios de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência:

Para este ensaio, 5×10^6 conídios foram fixados com paraformaldeído a 4% durante 30 min e posteriormente submetidos a três lavagens com tampão PBS. Em seguida, os conídios foram incubados por 1 h com concentrações variáveis de fibronectina (25 a 200 µg/ml). Os conídios foram lavados três vezes com PBS e incubados por 1 h com anticorpo primário anti-fibronectina na diluição de 1:100. As amostras foram centrifugadas e lavadas três vezes como descrito acima. Em seguida, as células foram

incubadas por 1 h com anticorpo secundário (IgG de coelho) conjugado à FITC na diluição de 1:400. A partir desta fase, todas as amostras foram mantidas no escuro. Por fim, as células foram submetidas à nova lavagem e, então, examinadas no citômetro de fluxo. Após a leitura no FACS, o material restante foi centrifugado e as células recuperadas utilizadas para microscopia de fluorescência. O mesmo procedimento realizado para as amostras de conídios foi aplicado de modo a se obter as micrografias de fluorescência do micélio de *P. boydii*. Células incubadas somente com anticorpo secundário foram utilizadas como controles negativos.

3.27) Imunocitoquímica:

Os conídios (1×10^7) foram fixados em tampão cacodilato 0,1 M contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 0,2% de ácido pícrico e CaCl_2 5 mM. Após 1 h de fixação, os conídios foram desidratados em etanol e embebidos em resina (Unicryl) a -20°C . Seções ultrafinas da resina foram colocadas em grades de níquel e incubadas em TBS 0,1 M e cloreto de amônio 50 mM. Após três lavagens em TBS, as grades foram finalmente incubadas com a fibronectina solúvel na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, posteriormente as grades foram incubadas com anticorpo anti-fibronectina (diluído 1:100 em PBS, 1% BSA e 1% Tween 20) e subsequentemente com anticorpo secundário IgG (diluído 1:10) conjugado a partículas de ouro (15 nM). Após coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo, as seções ultrafinas foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss 10C). Um controle negativo foi realizado, onde omitimos a incubação com a fibronectina.

3.28) Ensaios de interação entre conídios de *P. boydii* e células animais modulado por fibronectina solúvel e anticorpo anti-fibronectina:

Com a finalidade de verificar a importância das proteínas ligadoras de fibronectina no processo de interação de *P. boydii* com células animais, suspensões de 1×10^6 conídios/ml em PBS, foram incubadas à temperatura ambiente por 1 h na ausência (controle) ou na presença 100, 200 ou 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fibronectina solúvel. Alternativamente, as células animais foram incubadas com anticorpo anti-fibronectina (Sigma) nas diluições de 1:100, 1:200 ou 1:400. Sistemas controle foram confeccionados, onde os conídios foram tratados com 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BSA e as células animais foram tratadas com IgG irrelevante. Os sistemas foram lavados três vezes com PBS e colocados para interagir pelo período de 2 h. Em seguida, os sistemas foram lavados com PBS e as lamínulas contendo a interação foram fixadas com Bouin por 10 min, lavadas com álcool, para retirada do excesso do Bouin, lavadas exaustivamente

com água destilada e coradas com Giemsa por 90 min, seguindo bateria de acetona/xilol. Após coloração, foi determinado o índice de associação dos conídios às células animais.

► **PARTE III: Análise proteômica do conteúdo secretado pelo micélio de *P. boydii*:**

3.29) Análise da viabilidade celular de formas micelianas após incubação em PBS condicionado:

Para excluir a possibilidade de liberação de proteínas por células mortas, a viabilidade celular de formas micelianas incubadas em PBS condicionado (item 3.5 desta sessão) foi avaliada. As células micelianas foram incubadas durante 30 min com calcofluor à temperatura ambiente. Posteriormente, os sistemas foram lavados com PBS e incubados com iodeto de propídio (PI) por 10 min. Após, os sistemas foram lavados com PBS e levados imediatamente para visualização em microscópio de fluorescência. Células mortas através de autoclavação foram utilizadas como controles positivos para marcação com o PI.

3.30) Eletroforese bi-dimensional (2DE):

As proteínas do sobrenadante condicionado PBS-glucose de *P. boydii* foram resolvidas por eletroforese bidimensional. Para tanto, a corrida do sobrenadante foi realizada, primeiramente, na faixa de pH 3-10 e posteriormente, de acordo com o perfil observado, em uma faixa de pH mais restrita para aumentar a resolução. A focalização isoelétrica (primeira dimensão) foi executada em equipamento Protean® IEF cell (Bio-Rad). Aliquotas do extrato protéico foram diluídas em solução de reidratação (uréia 8 M, 2% CHAPS, 40 mM ditiotreitol, 0,5% anfólitos 3-10) e, em seguida, foram aplicadas ao IPG-strip (17 cm, pH 4-7 ou pH 3-10 linear; Bio-Rad) pela técnica de reidratação "in gel". As corridas foram realizadas a uma temperatura de 20°C e uma corrente máxima de 50 mA/strip. Os parâmetros para focalização, que envolveram reidratação ativa e pelo menos seis etapas de gradiente de voltagem (até atingir 55000 V/h), foram otimizados para a amostra. A princípio os parâmetros foram: reidratação ativa (50 V) por 12 h; etapa 1- gradiente a partir de 1 até 250 V por 30 min; etapa 2- gradiente de 250 a 1000 V por 30 min; etapa 3- 1000 V constante por 1 h; etapa 4- gradiente de 1000 a 4000 V por 45 min; etapa 5- 4000 V constante por 1 h; etapa 6- 8000V até completar 55000 V/h. Completada a primeira dimensão os "strips" contendo as proteínas focalizadas foram preparadas para a segunda dimensão. Tal

etapa envolveu a redução (10 mg/ml DDT) e alquilação (25 mg/ml iodoacetamida) das cisteínas, usando-se um tampão de equilíbrio (6 M uréia, 2% SDS, 300 mM Tris-HCl pH 8,8, 20% glicerol). As tiras (strips) de IPG previamente equilibradas foram em seguida aplicadas em um gel SDS-PAGE 12% utilizando um sistema vertical (Bio-Rad) e o tampão de corrida padrão Tris/glicina/SDS. A corrida foi realizada em corrente 40 mA constante e temperatura de 15°C. Ao final da corrida, os géis foram corados com Coomassie Coloidal ou revelados com nitrato de prata. Para a documentação da imagem foi utilizado o "Imaging Densitometer" modelo GS-800 (Bio-Rad) e a análise do gel foi realizada com o software PDQuest™ (Bio-Rad). Estes experimentos foram realizados sob a supervisão da Pesquisadora Catia Sodré - FIOCRUZ.

3.31) Digestão "in-gel" e identificação de proteínas por espectrometria de massa:

Para a realização da digestão enzimática, os "spots" (colocar aspas nas palavras em inglês que fiquem no texto final) de interesse foram manualmente cortados do gel e submetidos à digestão com tripsina. Os spots de géis foram lavados 3 vezes com 50% de acetonitrila (v/v) por 15 min (cada), e então desidratados em acetonitrila (ACN) 100%. Em seguida os géis foram reidratados em solução de tripsina (~6 ng/ml de 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0) e mantidas a 4°C por 45 min. O excesso de solução de tripsina foi removido e substituído com solução de 25 mM de bicarbonato de amônio, pH 8,0, com volume suficiente para cobrir os géis. Em seguida, para a digestão da amostra, os géis foram incubados a 37°C por 12 h. Os peptídeos resultantes da digestão, quando houve necessidade, foram extraídos em solução de ACN 50% (v/v) em ácido trifluoroacético (TFA) 0,5% por cerca de 30 min de sonicação. Posteriormente, os peptídeos tripticos extraídos foram purificados em cromatografia de fase reversa usando-se colunas de ZipTip C18 (Millipore), e eluídos da coluna com solução de 50% ACN em TFA 01%. Uma pequena alíquota (0,3 µl) da solução de mistura de peptídeos foi retirada para a análise em espectrômetro de massa. Os fragmentos peptídicos foram submetidos a análises em espectrômetro de massa MALDI/TOF-TOF modelo 4700-Proteomics Analyzer (Applied Biosystem). Previamente à análise, as amostras foram preparadas segundo o método "dried-droplet". Aproximadamente 0,3 µL da amostra foi misturada com igual volume de solução de matriz (α -ciano-4-hidroxicinamico 7 mg/ml 50% ACN em TFA 01%) e aplicadas na placa-alvo ("target plate"). Os espectros de massa (MS) foram adquiridos em modo positivo e operados em modo refletor com uma aceleração de voltagem de 20 kV, e cerca de 2000 tiros de laser por spot. Os 5 ou 10 sinais mais intensos na análise de MS1 foram selecionados para a MS2, ou seja, fragmentação por PSD usando-se 1 KeV de energia de colisão. GPS data explorer foi empregado para gerar arquivos pps. Os espectros MS foram então submetidos à busca

contra o banco de dados de proteínas não-redundantes do NCBIInr, usando-se o programa MASCOT version 2.2. Em geral, somente peptídeos com "score" maior que 30 e contendo uma sequência de pelo o menos 4 aminoácidos foram considerados para identificar as proteínas. Os espectros que não retornarem nenhum resultado foram analisados manualmente para a obtenção da sequência de aminoácidos e posteriormente buscados contra bancos de dados disponíveis para o genoma de outros patógenos fúngicos (ex: *C. albicans*, *A. fulmigatus*, *C. neoformans* e *P. brasiliensis*), uma vez que o genoma de *P. boydii* ainda não foi sequenciado. Estes experimentos foram realizados sob a supervisão dos Pesquisadores Catia Sodré e Dario Kalume - FIOCRUZ.

3.32) Validação das análises do proteoma: dosagem química da atividade de algumas enzimas identificadas no secretoma de *P. boydii*:

3.32.1) Malato desidrogenase:

Para quantificar a atividade da enzima malato desidrogenase, o sobrenadante PBS condicionado (20 µg/ml de proteína) foi adicionado ao meio de reação contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 2 mM malato de sódio and 2 mM NAD⁺. A formação de NADH foi avaliada através de espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm. Foi estabelecido que uma unidade de malato desidrogenase foi capaz de formar 1 µmol NADH por minuto de reação (STEFFAN & MCALISTER-HENN, 1992).

3.32.2) Adenilato quinase:

A formação de ATP a partir do ADP foi avaliada através do consumo do ATP formado pela enzima fosfofrutoquinase que tem a capacidade de fosforilar a frutose-6-fosfato formando frutose-1,6-bisfosfato. Os ensaios foram realizados em meio de reação contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM frutose-6-fosfato, 1 mM ADP, 2 mM NADH, 2 U/ml fosfofrutoquinase, 1,5 U/ml aldolase, 3 U/ml triosefosfato isomerase, 3 U/ml α-glicerolfosfato desidrogenase. A reação foi iniciada pela adição do sobrenadante PBS condicionado (20 µg/ml de proteína). A oxidação do NADH foi avaliada através de espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm. Foi estabelecido que uma unidade de adenilato foi capaz de formar 1 µmol de ATP por minuto de reação (SOLA-PENNA *et al.*, 2002).

3.32.3) Triosefosfato isomerase:

A atividade da triosefosfato isomerase foi quantificada através da conversão do gliceraldeído-3-fosfato a di-hidroxicetona fosfato seguido pela redução desta a α -glicerolfosfato catalizado pela α -glicerolfosfato desidrogenase. Os ensaios foram realizados em meio de reação contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 2 mM de gliceraldeído desidrogenase, 2 mM NADH, 3 U/ml α -glicerolfosfato desidrogenase. A reação foi iniciada pela adição do sobrenadante PBS condicionado (20 μ g/ml de proteína). A oxidação do NADH foi avaliada através de espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm. Foi estabelecido que uma unidade de triosefosfato desidrogenase foi capaz de oxidar 1 μ mol de NADH por minuto de reação (MEIRA *et al.*, 2005).

3.32.4) Aldolase:

A reação foi iniciada pela adição do sobrenadante PBS condicionado (20 μ g/ml de proteína) em meio de reação contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 1 mM frutose-1,6-bisfosfato, 2 mM NADH, 3 U/ml triosefosfato isomerase, 3 U/ml α -glicerolfosfato desidrogenase. A oxidação do NADH foi avaliada através de espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm. Foi estabelecido que uma unidade de aldolase foi capaz de oxidar 1 μ mol de NADH por minuto de reação (MEIRA *et al.*, 2005).

3.32.5) Manitol-1-fosfato-5-desidrogenase:

A reação foi iniciada pela adição do sobrenadante PBS condicionado (20 μ g/ml de proteína) em meio de reação contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 1 mM frutose-6-fosfato e 2 mM NADH. A oxidação do NADH foi avaliada através de espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm. Foi estabelecido que uma unidade de manitol-1-fosfato-5-desidrogenase foi capaz de oxidar 1 μ mol de NADH por minuto de reação (IWAMOTO *et al.*, 2003).

3.32.6) Aspártico peptidase:

A dosagem enzimática de aspártico peptidase foi realizada através da degradação de substrato fluorogênico específico para aspártico peptidase do HIV e substrato fluorogênico específico para renina em procedimento adaptado do método descrito por BARRET e colaboradores (1980). A reação foi iniciada através da adição de 20 μ M do substrato a 10 μ g do

PBS condicionado de *P. boydii*, diluídos em tampão 0,1 M citrato de sódio, pH 4,0. A mistura de reação foi incubada a 37°C por 15 min e a intensidade de fluorescência foi determinada por espectrofotofluorimetria (SpectraMax Gemini XPS, Molecular Devices, CA, USA), utilizando comprimentos de onda de emissão e excitação a 460 e 380 nm, respectivamente.

Resultados

4) RESULTADOS

► PARTE I: Avaliação do efeito de 1,10-fenantrolina e de seus derivados em eventos da biologia de *P. boydii*:

4.1) Efeito de 1,10-fenantrolina na atividade proteolítica de *P. boydii*:

Com a finalidade de evidenciar as atividades proteolíticas presentes nos extratos celulares de micélio e de conídios de *P. boydii*, realizou-se uma dosagem química utilizando-se BSA como substrato solúvel. Após a digestão enzimática foi observada uma maior atividade proteolítica associada ao extrato celular das hifas quando comparado ao extrato de conídios de *P. boydii* (**Fig. 7A**). Todas as atividades proteolíticas associadas às células foram completamente inibidas na presença de 1,10-fenantrolina a 10 mM, sugerindo a atividade de metalopeptidases, provavelmente zinco-dependentes (**Fig. 7A**). A avaliação do perfil das peptidases produzidas por ambas as formas foi analisada por SDS-PAGE contendo BSA como substrato copolimerizado. Os resultados corroboram os dados obtidos na dosagem química, uma vez que se detectou no extrato do conídio uma única atividade proteolítica de aproximadamente 28 kDa, ao passo que no extrato do micélio pelo menos 6 diferentes halos de hidrólise foram observados entre 28 e 90 kDa, sendo todas as atividades celulares inibidas por 1,10-fenantrolina (**Fig. 7B**).

A atividade proteolítica secretada também foi avaliada através da degradação de BSA solúvel. O PBS condicionado foi incubado com BSA na ausência ou na presença de diferentes inibidores de metalopeptidases. Foi observado que a atividade proteolítica presente no PBS condicionado foi capaz de hidrolisar a molécula de BSA solúvel, gerando fragmentos protéicos com baixas massas moleculares. 1,10-fenantrolina (10 mM) e EDTA (100 mM) bloquearam a atividade proteolítica secretada, enquanto EGTA (100 mM) não inibiu este processo (**Fig. 7C**). Através de BSA-SDS-PAGE evidenciou-se a presença de duas atividades proteolíticas de 28 e 35 kDa, sensíveis à ação do inibidor 1,10-fenantrolina (**Fig. 7D**).

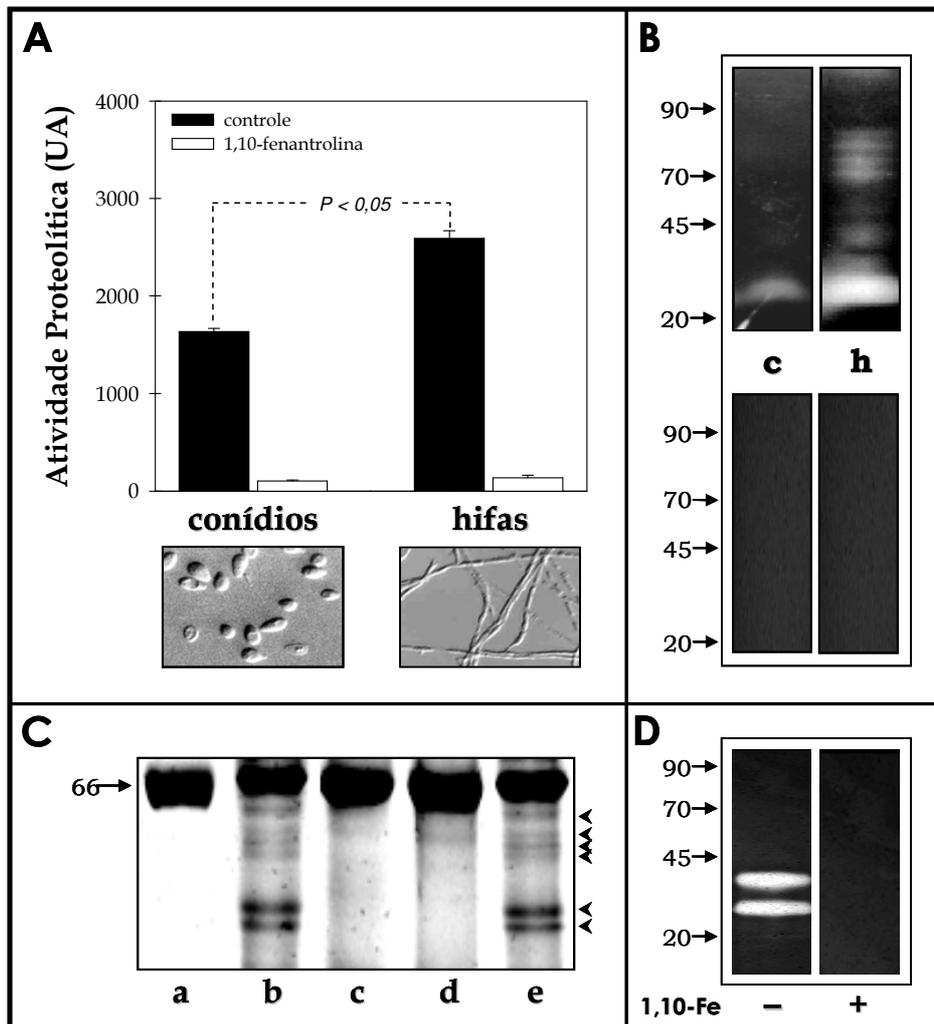


Fig. 7: Efeito de 1,10-fenantrolina na atividade proteolítica de *P. boydii*: (A) Dosagem química da atividade proteolítica presente nos extratos celulares de conídios e micélio de *P. boydii*. O controle representa a atividade máxima detectada nos extratos, mensurada na presença de BSA como substrato solúvel. Os demais sistemas foram previamente incubados com 1,10-fenantrolina por 30 min à temperatura ambiente e em seguida, adicionada de substrato protéico. A atividade enzimática foi expressa em unidades arbitrárias (UA). (B) BSA-SDS-PAGE mostrando o perfil de peptidases associados aos conídios (c) e hifas (h). Os géis foram incubados por 48 h a 37°C em tampão fosfato, pH 5,5, na ausência (géis na porção superior da figura) ou presença (géis na porção inferior da figura) de 1,10-fenantrolina 10 mM. Os números à esquerda se referem às massas moleculares de proteínas padrões, expressos em kilodalton (kDa). (C) Perfil de inibição da degradação do BSA pelo PBS condicionado obtido a partir de micélio de *P. boydii*. Aliquotas do PBS condicionado foram incubadas previamente na ausência (b) e na presença de diferentes inibidores: 1,10-fenantrolina a 10 mM (c), EDTA a 100 mM (d) e EGTA a 100 mM (e). Em seguida os sistemas foram adicionadas de 10 µl de tampão fosfato, pH 5,5, 10 µl de BSA e incubados por 20 h a 37°C. Os géis foram corados com Coomassie brilliant blue R-250. Em (a) o perfil do BSA incubado somente com o tampão fosfato (controle). O número à esquerda se refere à massa molecular do BSA. As cabeças de setas à direita mostram os fragmentos de degradação do BSA. (D) BSA-SDS-PAGE mostrando o perfil de peptidases secretadas pelas formas micelianas. Os géis foram incubados por 48 h a 37°C em tampão fosfato, pH 5,5, na ausência (-) ou presença (+) de 1,10-fenantrolina 10 mM. Os números à esquerda se referem às massas moleculares de proteínas padrões.

4.2) Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados na atividade proteolítica secretada por *P. boydii*:

O efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados na atividade proteolítica secretada pelo micélio de *P. boydii* foi também analisado através de dosagem química de atividade proteolítica utilizando-se BSA como substrato solúvel. Nesse sentido, o PBS condicionado foi incubado na ausência ou na presença de 1,10-fenantrolina e seus derivados, na concentração de 100 µg/ml. Os resultados mostraram que todos os compostos utilizados inibiram em aproximadamente 80% a atividade proteolítica secretada (**Fig. 8**).

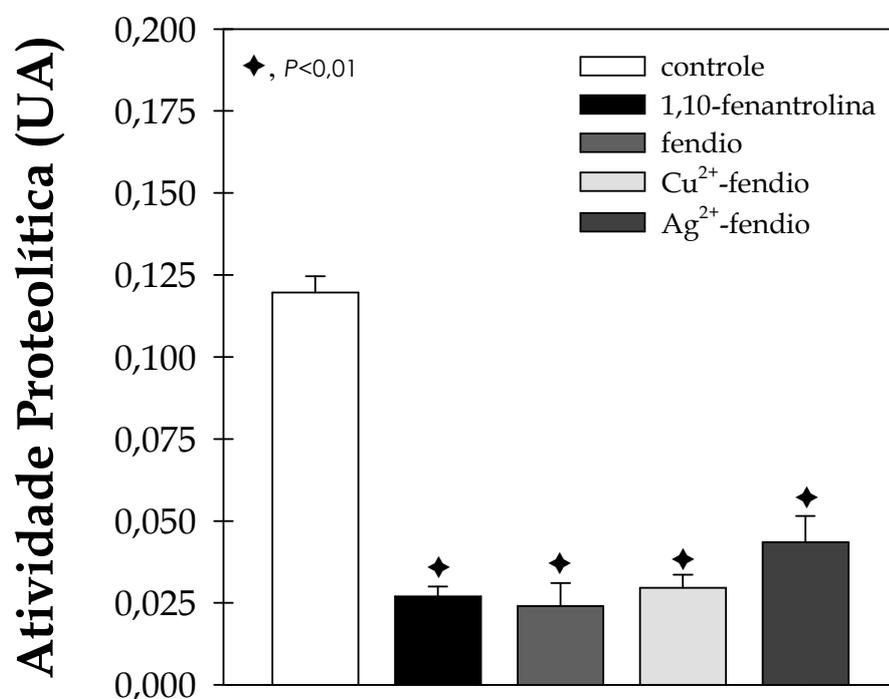


Fig. 8: Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados na atividade proteolítica secretada pelo micélio de *P. boydii*: Dosagem química da atividade proteolítica presente no PBS condicionado de *P. boydii*, utilizando-se BSA como substrato protéico solúvel. O controle representa a atividade proteolítica máxima detectada no PBS condicionado. Os demais sistemas foram previamente incubados com 1,10-fenantrolina, fendio, Cu²⁺-fendio ou Ag²⁺-fendio por 30 min à temperatura ambiente e, em seguida, adicionados do substrato. A atividade enzimática foi expressa em unidades arbitrárias (UA). O símbolo (♦) representa os sistemas em que há diferença estatística significativa entre o controle e os sobrenadantes previamente incubados com os diferentes inibidores de metalopeptidases.

4.3) Influência de 1,10-fenantrolina e de seus derivados na viabilidade celular de conídios de *P. boydii*:

Este ensaio foi realizado incubando-se 1×10^3 conídios por 16 h na ausência ou na presença de 1,10-fenantrolina e seus derivados em concentrações que variaram de 0,001 a 1 $\mu\text{g/ml}$. De uma forma geral, os compostos afetaram a viabilidade do fungo de forma dose-dependente (**Fig. 9**). A 1,10-fenantrolina se mostrou o inibidor menos eficaz, visto que apresentou efeito fungicida apenas na maior concentração utilizada (1 $\mu\text{g/ml}$). O fendio se mostrou a droga mais eficaz apresentando efeito fungicida sobre os conídios de *P. boydii* nas concentrações de 0,1 e 1 $\mu\text{g/ml}$; este inibidor foi capaz de promover morte em aproximadamente 50% das células na concentração de 0,01 $\mu\text{g/ml}$. O Ag^{2+} -fendio e o Cu^{2+} -fendio apresentaram um efeito similar, sendo ambos capazes de causar morte de aproximadamente 50% das células na concentração de 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Os inibidores na concentração de 0,001 $\mu\text{g/ml}$ não alteraram a viabilidade fúngica. O DMSO, que foi o solvente utilizado na diluição dos compostos, não interferiu na viabilidade dos conídios (**Fig. 9**).

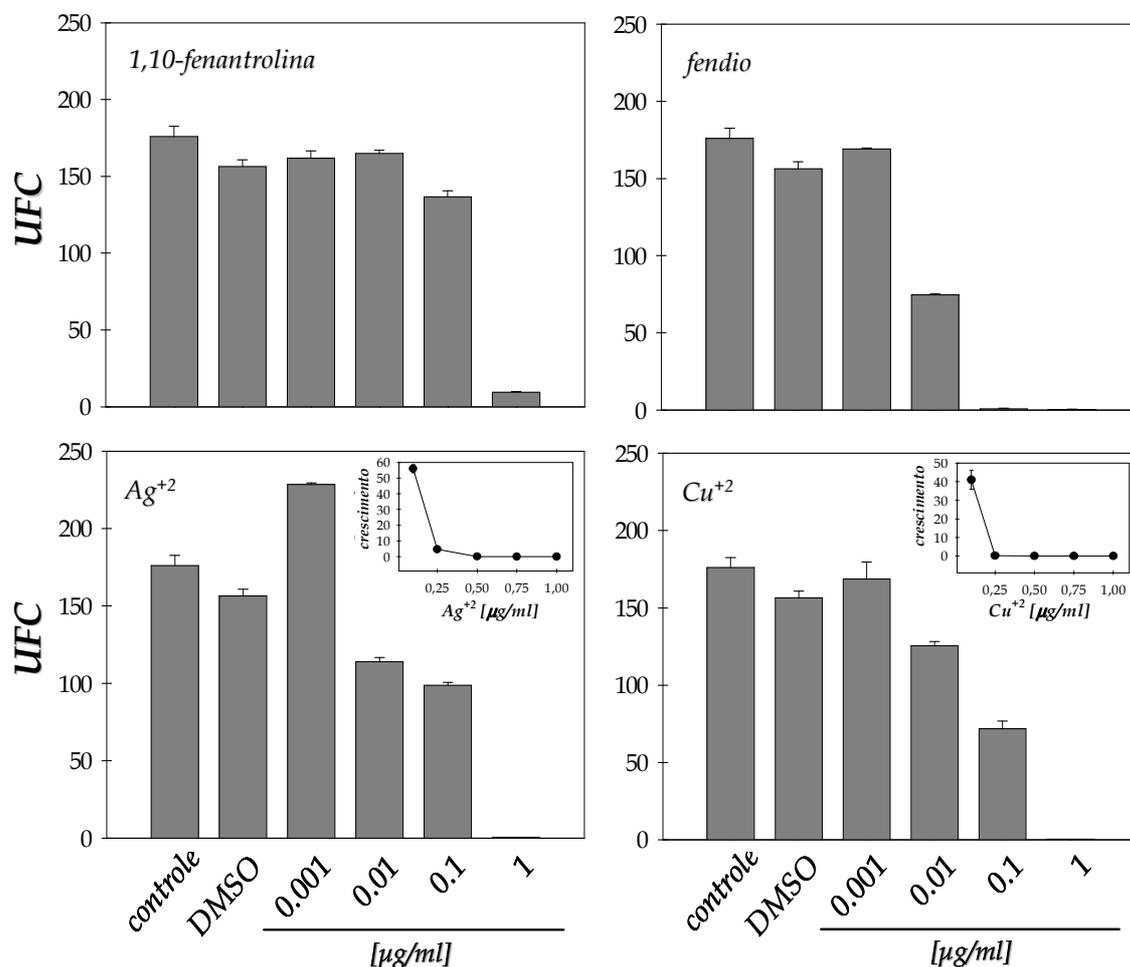


Fig 9: Influência dos inibidores de metalopeptidases na viabilidade celular das formas conidias de *P. boydii*. O fungo foi crescido em meio Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. Posteriormente, 10³ conídios foram incubados na presença ou na ausência dos inibidores de metalopeptidases em diferentes concentrações (0,001 - 1 µg/ml) à temperatura ambiente por 16 h. Após o período de incubação, os conídios foram novamente lavados com PBS, incubados em meio ágar Sabouraud para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

4.4) Influência de 1,10-fenantrolina e de seus derivados no desenvolvimento de micélio de *P. boydii*:

Um ponto crucial no desenvolvimento dos fungos filamentosos é a diferenciação das formas conidianas em micélio; por esta razão, avaliamos o efeito dos inibidores de metalopeptidases nas formas de micélio de *P. boydii*. Para tal, 10^3 conídios foram incubados em placas de 96 poços contendo meio Saboraud por 48 h para total diferenciação em formas micelianas (SILVA *et al.*, 2009). Posteriormente, os sistemas foram incubados com os inibidores proteolíticos em diferentes concentrações (0,001 a 1 $\mu\text{g/ml}$) por 16 h. Após esse período, os sistemas foram lavados com PBS e plaqueados em ágar Saboraud para posterior contagem de UFCs.

Como observado na **Fig. 10**, todos os compostos inibiram de modo significativo, e quase que completamente, o crescimento fúngico na concentração de 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Na concentração de 0,01 $\mu\text{g/ml}$, a 1,10-fenantrolina se mostrou capaz de inibir cerca de 50% do crescimento fúngico. Porém, nesta mesma concentração, os outros inibidores se mostraram mais eficazes; principalmente, o fendio e o Ag^{2+} -fendio, que inibiram aproximadamente 70% do crescimento fúngico. O fendio se mostrou o melhor inibidor neste ensaio, pois na menor concentração utilizada foi capaz de inibir cerca de 70% do crescimento do micélio. O DMSO não alterou de forma significativa o crescimento celular das formas micelianas, visto que o sistema tratado apenas com o DMSO apresentou crescimento similar ao do controle.

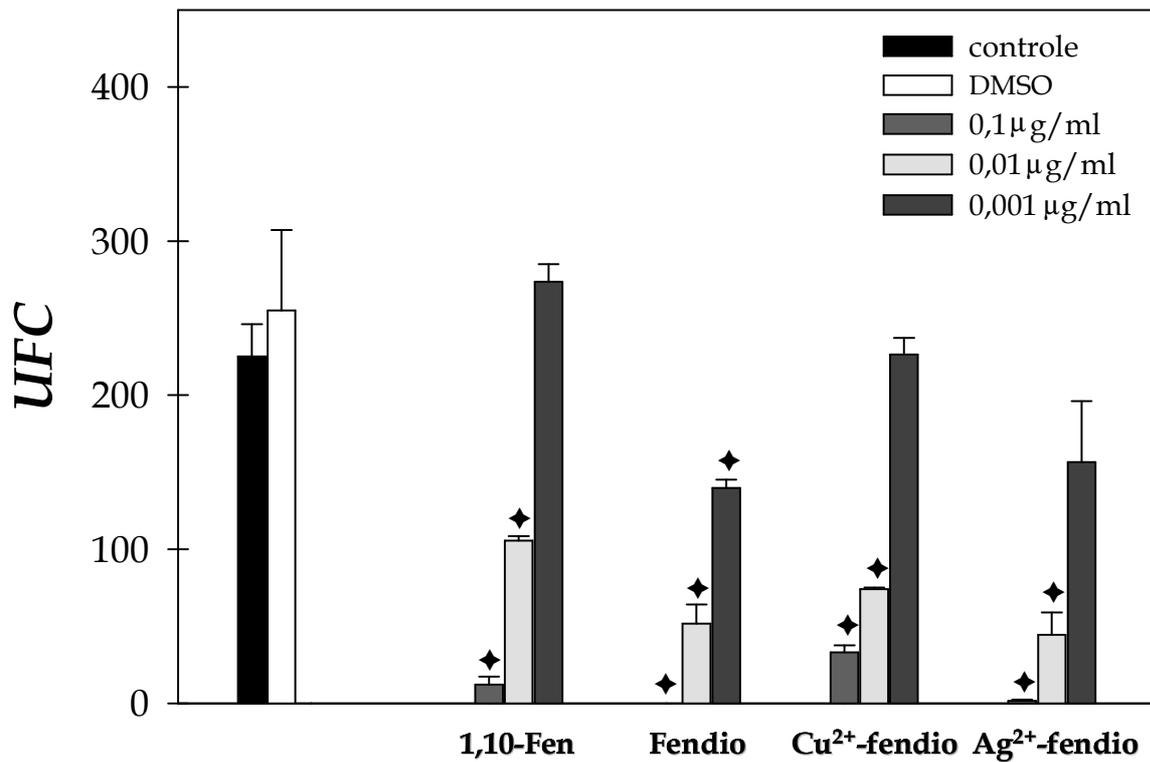


Fig 10: Efeito dos inibidores de metalopeptidases na viabilidade celular das formas micelianas de *P. boydii*. O fungo foi crescido em meio Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. Posteriormente, 10^3 conídios foram incubados em placas de 96 poços contendo meio Sabouraud por 48 h, para total diferenciação em micélio. Depois da diferenciação, os sistemas foram lavados e colocados na presença ou na ausência dos inibidores de metalopeptidases em diferentes concentrações (0,001 - 0,1 $\mu\text{g/ml}$) à temperatura ambiente por 16 h. Após o período de incubação, os sistemas foram novamente lavados com PBS, incubados em meio agar Sabouraud para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Os símbolos (♦) representam os sistemas que foram estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) em relação ao controle.

4.5) Influência de 1,10-fenantrolina e de seus derivados no processo de diferenciação celular de *P. boydii*:

Com a finalidade de avaliar o efeito de 1,10-fenantrolina e de seus derivados sobre o processo de diferenciação celular de *P. boydii*, 5×10^6 conídios foram incubados em meio Sabouraud na ausência ou na presença dos inibidores em diferentes concentrações, por 16 h, à temperatura ambiente. Os resultados demonstraram que na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ todos os inibidores foram capazes de inibir o processo de diferenciação celular, enquanto que na concentração de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ apenas o fendio e o Ag^{2+} -fendio apresentaram o mesmo efeito. Os demais inibidores, quando utilizados na concentração de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, inibiram este processo em menor proporção (**Tabela 2 e Fig. 11**).

Vale ressaltar que além da observação das lâminas para a contagem da diferenciação, os conídios foram lavados com PBS e plaqueados em meio Sabouraud para contagem de UFC. Após 7 dias de incubação, observou-se um crescimento similar dos conídios pré-tratados ou não com os inibidores, mostrando que os efeitos observados com a inibição da diferenciação não foram devidos à perda de viabilidade dos conídios (dados não mostrados).

Tabela 2: Influência de 1,10-fenantrolina e seus derivados na diferenciação celular de *P. boydii*.

<i>Sistemas</i>	<i>Diferenciação Celular (conídio → micélio)</i>			
	Concentrações dos inibidores proteolíticos			
	1 µg/mL	0,1 µg/mL	0,01 µg/mL	0,001 µg/mL
1,10-fenantrolina	- - -	- - +	- + +	+ + +
Fendio	- - -	- - -	- + +	+ + +
Cu ²⁺ -fendio	- - -	- - +	- + +	+ + +
Ag ²⁺ -fendio	- - -	- - -	- + +	+ + +

+, diferenciação de conídio a micélio.

-, inibição da diferenciação do conídio a micélio.

O número de sinais indica uma quantificação visual do processo de diferenciação de conídio a micélio, onde no sistema controle (sem adição de nenhuma droga) todos os conídios diferenciaram-se a micélio (+++).

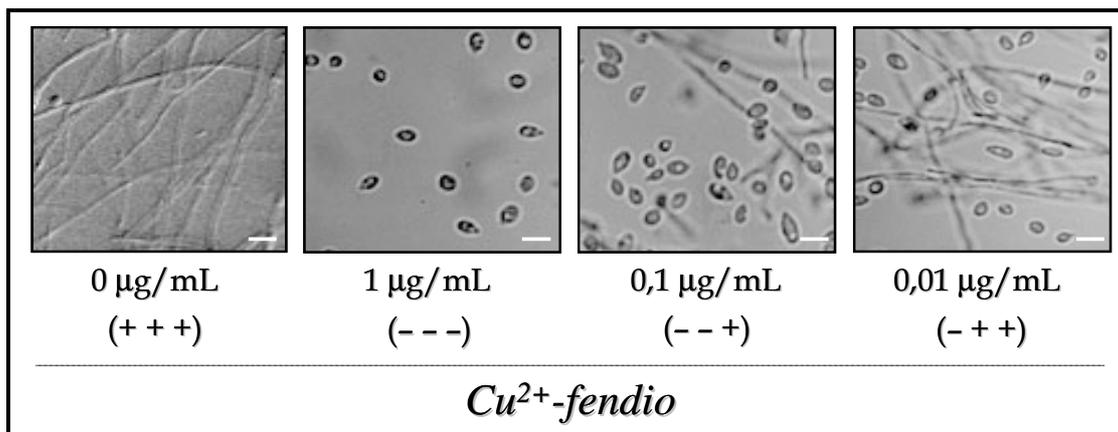


Fig. 11: Efeito de diferentes concentrações do inibidor Cu²⁺-fendio no processo de diferenciação celular de *P. boydii*. Os símbolos representam uma quantificação do percentual de diferenciação, onde - - - representa ausência de diferenciação (somente conídios foram observados) e +++ representa o máximo de diferenciação celular (onde somente hifas foram detectadas).

4.6) Influência de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre a formação de biofilme por *P. boydii*:

Nada é sábio sobre a capacidade de *P. boydii* em formar biofilme, sendo assim, avaliamos a capacidade deste fungo em aderir a uma superfície de poliestireno. Primeiramente foi realizada uma cinética de formação de biofilme com diferentes densidades celulares. Nesse ensaio foi observado que a formação de biofilme parece não ser dependente do número de células iniciais. Observou-se também uma maior formação dos agregados celulares em 48 h de incubação (**Fig. 12 A**).

Posteriormente foi avaliada a capacidade dos inibidores de metalopeptidases em modular a formação do biofilme em *P. boydii* (**Fig. 12 B**). Para tal, foi escolhida a densidade de 10^6 células e o tempo de 48 h. Neste ensaio, 1,10-fenantrolina e seus derivados foram utilizados de três maneiras diferentes: na primeira, os conídios foram pré-tratados por 20 h com os compostos; na segunda, os compostos foram adicionados aos sistemas durante todo o período de adesão ao poliestireno (48 h) e na terceira, os compostos foram adicionados após 48 h de formação do biofilme, por 20 h adicionais. Os resultados mostraram um efeito inibitório mais expressivo dos compostos fendio, Cu^{2+} -fendio e Ag^{2+} -fendio. Nos sistemas onde os conídios foram pré-tratados, os compostos foram capazes de inibir aproximadamente 50% da formação do biofilme. No entanto, 1,10-fenantrolina não promoveu nenhum efeito inibitório na formação do biofilme de *P. boydii*. Nos sistemas onde os inibidores foram incubados juntamente com os conídios observou-se um efeito inibitório menos drástico que o anterior; porém, fendio, Cu^{2+} -fendio e Ag^{2+} -fendio foram capazes de inibir de modo significativo a formação de biofilme em cerca de 35%. No terceiro esquema de formação de biofilme, 1,10-fenantrolina e fendio foram capazes de inibir em 30% a formação do biofilme, enquanto Cu^{2+} -fendio e Ag^{2+} -fendio não foram capazes de desorganizar o biofilme já formado.

Posteriormente foi realizado um ensaio com conídios de *P. boydii* pré-tratados com 1,10-fenantrolina e seus derivados, no qual os sistemas foram colocados para aderir a lamínulas de vidro e a formação do biofilme foi observada através de microscopia eletrônica de varredura (**Fig. 13**). Nos sistemas controles e nos sistemas tratados com 1,10-fenantrolina, os fungos encontravam-se aderidos de forma homogênea à lamínula de vidro, dados que corroboraram o experimento de adesão ao poliestireno e revelado com o corante cristal violeta. Nestes sistemas, detectou-se a diferenciação massiva dos conídios a hifas (**Fig. 13 a, b, e**). A presença de poucos conídios aderidos, bem como a completa ausência de hifas, foi observada nos sistemas tratados com fendio, Cu^{2+} -fendio e Ag^{2+} -fendio (**Fig. 13 c, d, f**).

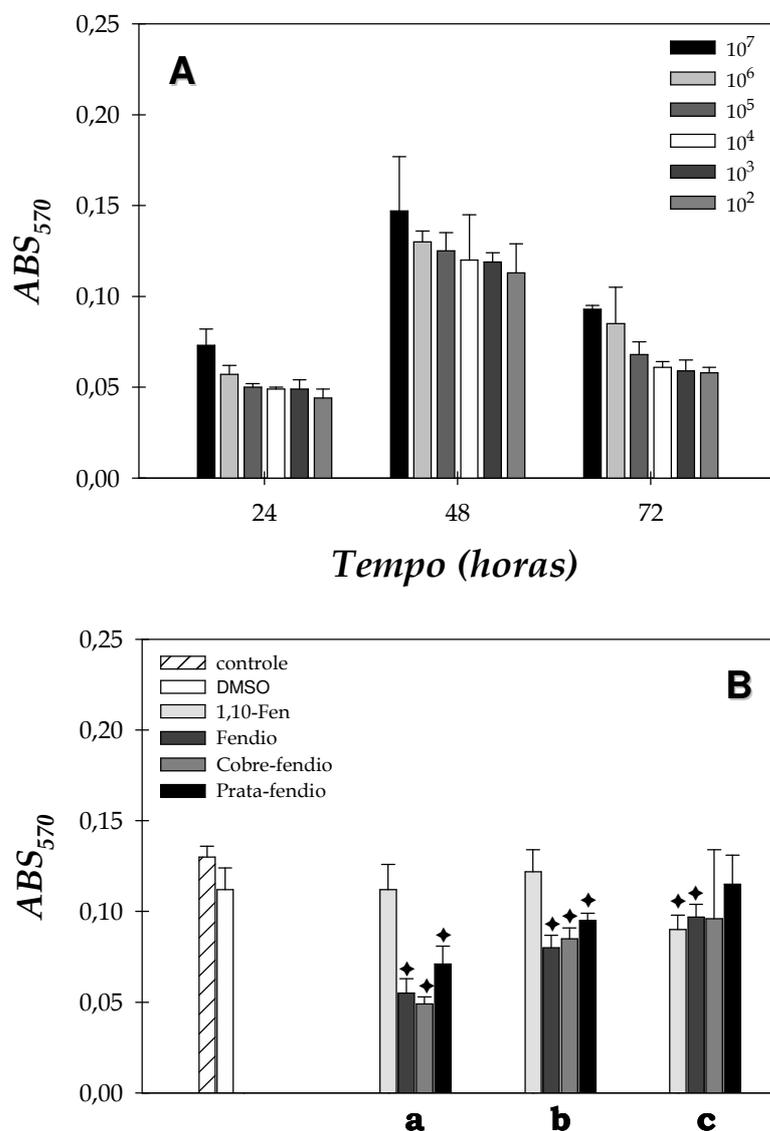


Fig 12: Influência de 1,10-fenantrolina e seus derivados na formação de biofilme por *P. boydii*. O fungo foi crescido em meio Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. **(A)** Cinética de formação de biofilme em uma superfície de poliestireno durante 24, 48 e 72 h, variando-se o inóculo de conídios (10^2 a 10^6 células). **(B)** 1×10^6 conídios foram incubados em placas de 96 poços de poliestireno contendo meio Sabouraud por 48 h. **(a)** Os conídios foram pré-tratados com 1,10-fenantrolina e seus derivados. **(b)** A 1,10-fenantrolina e seus derivados foram incubados juntamente com os conídios durante as 48 h de adesão. **(c)** Após 48 h de formação do biofilme, os sistemas foram tratados com 1,10-fenantrolina e seus derivados por 20 h adicionais. Os símbolos representam os sistemas que foram estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) em relação ao controle.

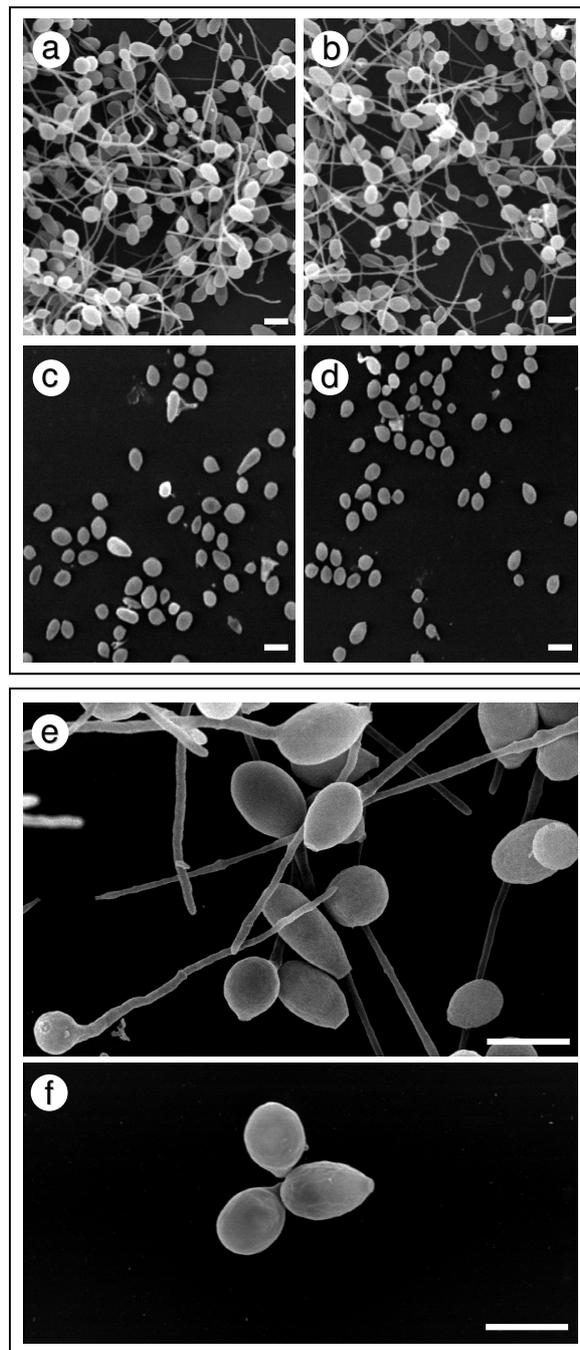


Fig 13: Microscopia eletrônica de varredura mostrando o efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados na formação de biofilme em *P. boydii*. O fungo foi crescido em meio Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. Posteriormente, 1×10^6 conídios tratados ou não tratados com 1,10-fenantrolina e seus derivados foram colocados para aderir a uma placa de 24 poços com lamínulas de vidro por 48 h. Após o período de adesão, os sistemas foram lavados com PBS, preparados para microscopia eletrônica de varredura (como mencionado no item 3.8) e visualizados em microscópio eletrônico. **(a)** controle, **(b)** sistema tratado com 1,10-fenantrolina, **(c)** sistema tratado com fendio e **(d)** sistema tratado com o Cu^{2+} -fendio. **(e)** e **(f)** representam maiores aumentos dos sistemas representados em **(b)** e **(d)**, respectivamente. O sistema tratado com Ag^{2+} -fendio teve o mesmo resultado que o mostrado em **(d)**. As barras correspondem a 5 μm .

4.7) Influência de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre a interação celular de conídios de *P. boydii* com células hospedeiras:

Sabendo da importância da interação dos patógenos com células hospedeiras durante o processo infeccioso, foi avaliado se 1,10-fenantrolina e seus derivados seriam capazes de modular o processo de interação celular de conídios de *P. boydii* com diferentes linhagens de células hospedeiras, incluindo macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c e células A549 e MRC-5. Nesse contexto, conídios de *P. boydii*, na proporção de 5:1 nos experimentos com macrófagos e 10:1 nos experimentos com as demais células animais, foram incubados por 1 h à temperatura ambiente na ausência ou na presença dos inibidores de metalopeptidases, na concentração subinibitória de 0,1 µg/ml (**Fig. 14**). Nos ensaios realizados com macrófagos observou-se que todos os compostos utilizados foram capazes de inibir de modo significativo a interação celular, sendo o fendio o modulador mais potente capaz de inibir o processo em aproximadamente 80%. No ensaio com as células A549, entretanto, a 1,10-fenantrolina e o fendio não foram capazes de modular a interação celular de modo significativo. Nesse modelo, apenas os derivados Cu²⁺-fendio e Ag²⁺-fendio mostraram-se eficazes. Na interação com a linhagem MRC-5, a 1,10-fenantrolina não inibiu o processo de interação de modo significativo, ao contrário de seus derivados (**Fig. 14**). O DMSO, solvente usado como diluente dos compostos, não interferiu no processo de interação celular (**Fig. 14**).

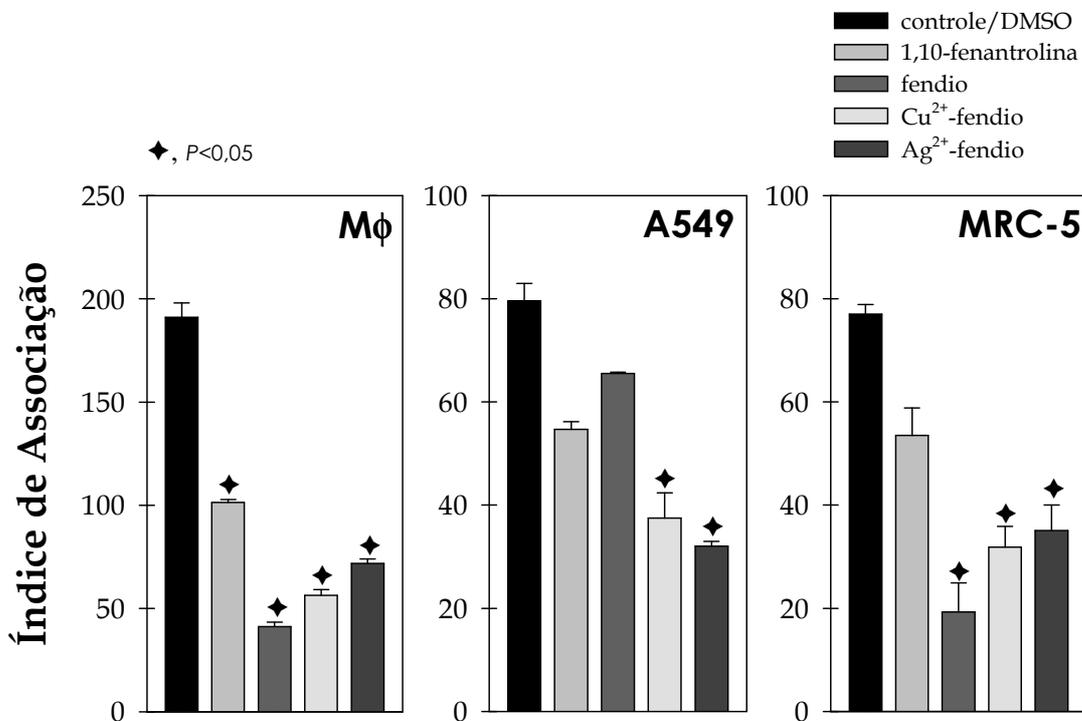


Fig. 14: Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados no processo de interação celular de conídios de *P. boydii* com células hospedeiras. O fungo foi crescido em ágar Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. Posteriormente, os conídios foram incubados na presença ou na ausência dos inibidores de metalopeptidases na concentração subinibitória de 0,1 µg/ml à temperatura ambiente por 1 h. Após o período de incubação, os conídios foram novamente lavados com PBS e colocados para interagir, na proporção de 5:1 com os macrófagos (MΦ), ou na proporção de 10:1 com as células A549 ou com a MRC-5 por 1 h a 37°C em estufa de CO₂. Após o período de interação, os sistemas foram lavados e corados com Giemsa para posterior contagem dos índices de associação. Os sistemas assinalados com o símbolo ♦ apresentaram índices de associação significativamente diferente dos conídios não tratados ($P < 0,05$; teste t de Student).

4.8) Tratamento de sistemas celulares com 1,10-fenantrolina e seus derivados após interação de conídios de *P. boydii* com macrófagos:

Para avaliar se os inibidores de metalopeptidases seriam capazes de matar os conídios de *P. boydii* internalizados por macrófagos e ou se os inibidores iriam aumentar seu poder antimicrobiano, foi realizado um ensaio onde após 1 h de interação dos conídios com os macrófagos, os sistemas foram lavados para retirada dos conídios não associados e tratados com 5 µg/ml de 1,10-fenantrolina e seus derivados por 2 h adicionais. A concentração de 5 µg/ml não se mostrou tóxica para os macrófagos peritoneais, como será mostrado no item 4.12 desta sessão. Após o período de tratamento, os sistemas foram lavados e os macrófagos foram lisados com água gelada e plaqueados em meio Sabouraud para posterior contagem de UFCs. Como resultado foi observado que todos os inibidores foram capazes de inibir de modo significativo o número de conídios intracelulares. Neste ensaio, o Ag²⁺-fendio se mostrou o composto mais eficaz, sendo capaz de inibir aproximadamente 40% do crescimento fúngico (Fig. 15).

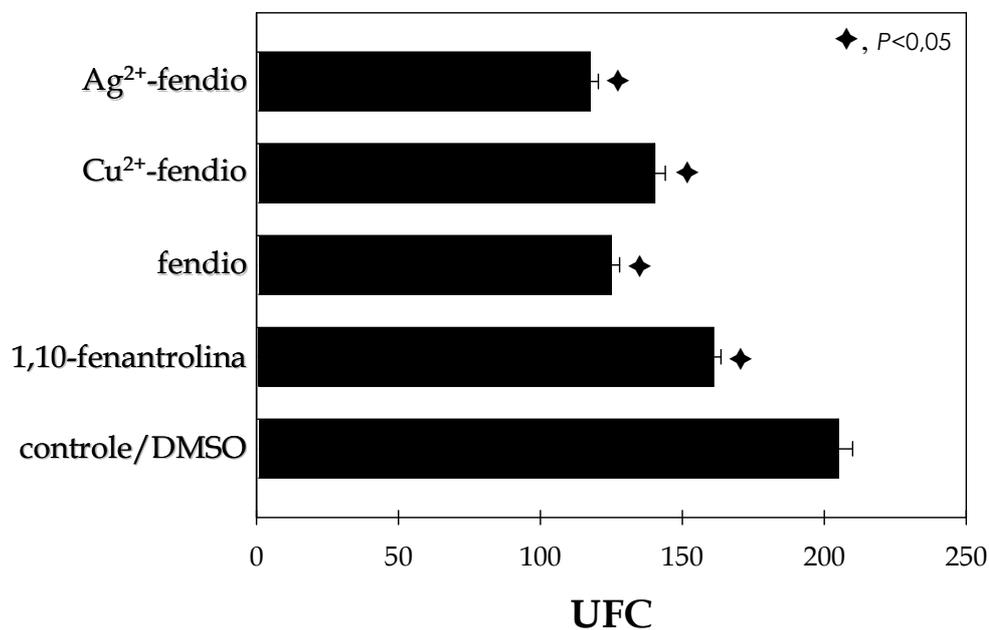


Fig. 15: Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados no processo de morte de conídios de *P. boydii* por macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c. O fungo foi crescido em ágar Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. Posteriormente, os conídios foram colocados para interagir, na proporção de 5:1, com macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c por 1 h. Após o período de interação, os sistemas foram lavados três vezes com PBS para retirada de conídios não aderidos. Após a lavagem os sistemas foram, então, incubados na presença ou na ausência dos inibidores de metalopeptidases na concentração de 5 µg/ml a 37°C por 2 h em estufa de CO₂. Posteriormente, os sistemas foram novamente lavados com PBS, os macrófagos foram lisados com água gelada e os extratos celulares foram plaqueados em ágar Sabouraud para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Os sistemas assinalados com o símbolo ♦ apresentaram crescimento significativamente diferente dos conídios não tratados ($P < 0,05$; teste *t* de Student).

4.9) Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre a morfologia de *P. boydii*:

Com a finalidade de observar o efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados na morfologia de *P. boydii*, as células foram tratadas com os compostos e preparadas para análise em microscópio eletrônico de varredura. Foi observado que fendio, Cu^{2+} -fendio e Ag^{2+} -fendio foram capazes de causar alterações na superfície e na morfologia da célula fúngica. As células tratadas com os inibidores apresentaram, de uma forma geral, uma superfície mais enrugada (tanto os conídios quanto as hifas). Aparentemente, algumas células apresentaram perda de conteúdo citoplasmático (células murchas). A 1,10-fenantrolina não foi capaz de causar alterações ultraestruturais detectáveis (**Fig. 16**).

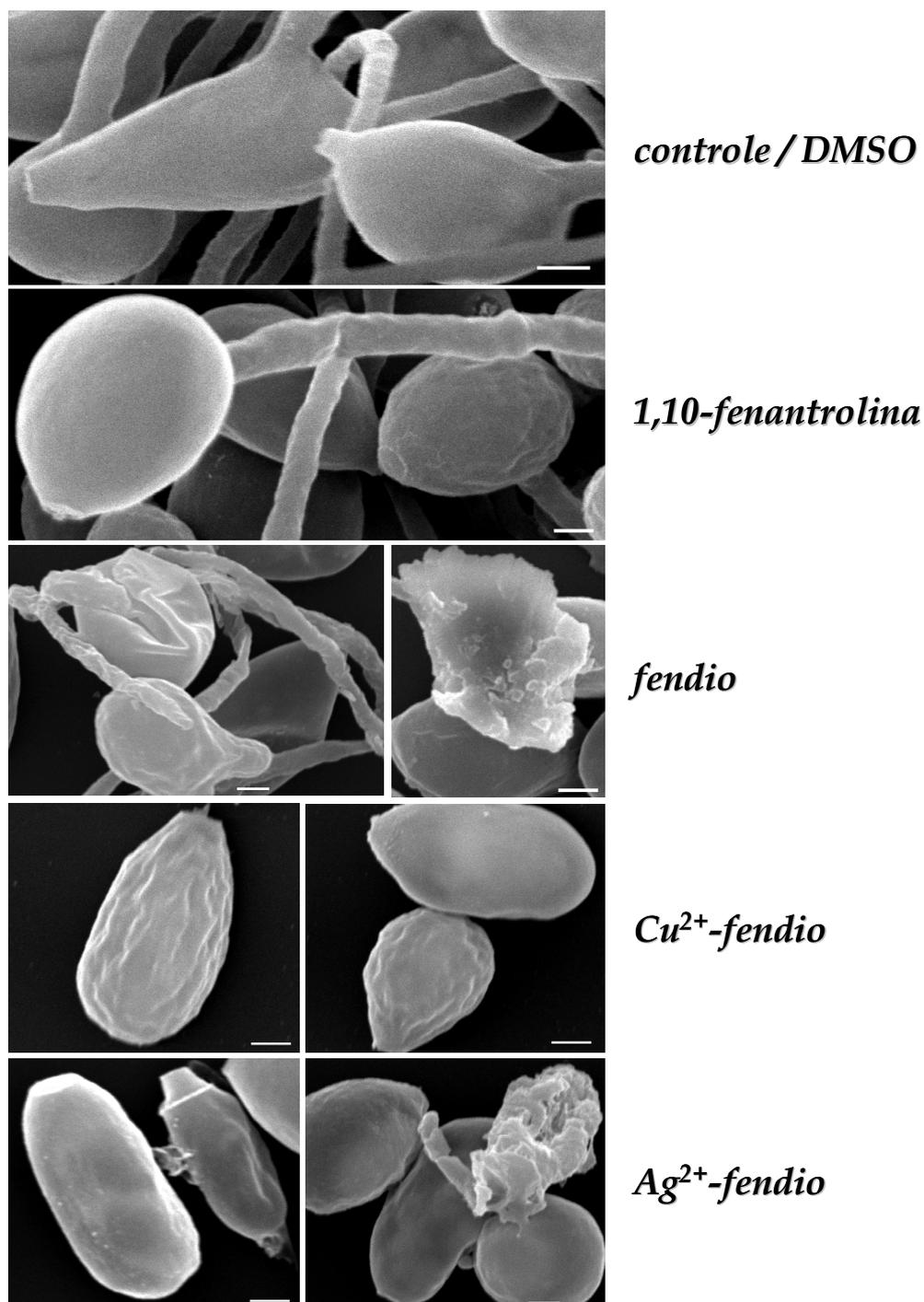


Fig. 16: Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados na morfologia de *P. boydii*. O fungo foi crescido em ágar Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. Posteriormente, os conídios (1×10^6) foram tratados com os diferentes inibidores de metalopeptidases na concentração de $1 \mu\text{g/ml}$ à temperatura ambiente por 16 h. Após o período de incubação, as células foram lavadas e preparadas para microscopia de varredura como descrito no item 3.17. Os sistemas foram visualizados em microscópio de varredura em um aumento de 10.000 vezes. As barras correspondem a $5 \mu\text{m}$.

4.10) Influência de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre a expressão de moléculas de superfície em *P. boydii*:

► expressão de glicoconjugados ricos em manose/glucose:

Diante da importância dos glicoconjugados de superfície em processos de interação celular e de nossos resultados mostrando que os inibidores de metalopeptidases modulam os índices de associação de *P. boydii* com células hospedeiras, avaliou-se o efeito destes compostos na expressão de glicoconjugados presentes na superfície do fungo. Assim, 1×10^6 conídios foram primeiramente incubados na ausência ou na presença dos diferentes inibidores proteolíticos na concentração subinibitória de $0,1 \mu\text{g/ml}$. Após o período de incubação, os conídios foram lavados e incubados com a lectina ConA-FITC por 1 h e, em seguida, analisados em citômetro de fluxo. Cu^{2+} -fendio foi o único composto capaz de modular negativamente a expressão de glicoconjugados ricos em manose/glucose na superfície celular de *P. boydii* (Fig. 17).

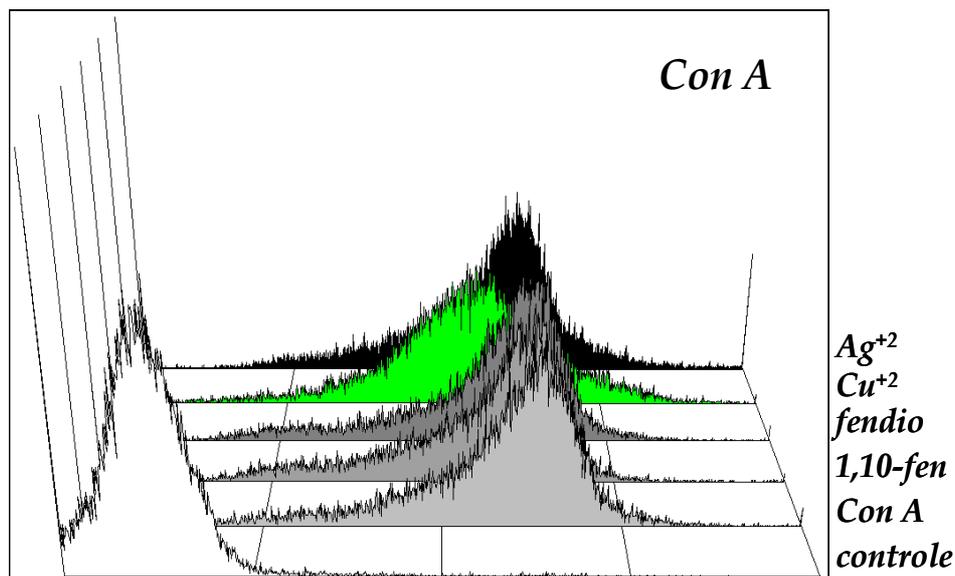


Fig. 17: Modulação da expressão de glicoconjugados ricos em manose/glucose presentes na superfície de conídios de *P. boydii*, após tratamento com os inibidores de metalopeptidases. O fungo foi crescido em ágar Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. Posteriormente, 1×10^6 conídios foram incubados na presença ou na ausência dos inibidores de metalopeptidases na concentração subinibitória de $0,1 \mu\text{g/ml}$ à temperatura ambiente por 16 h. Após o período de incubação, os conídios foram lavados com PBS e incubados com a lectina Con A ($25 \mu\text{g/ml}$) conjugada à fluoresceína por 1 h. Em seguida, os conídios foram lavados e analisados em citômetro de fluxo. A autofluorescência corresponde aos conídios sem incubação com a lectina.

► **expressão de peptideoramnana (PRM):**

Como mencionado anteriormente, a PRM é um peptidopolissacarídeo presente na parede celular de *P. boydii* que, além de ser uma molécula antigênica, influencia processos de adesão (PINTO *et al.*, 2001, 2004). Tendo em vista a importância da PRM para os processos de interação celular, avaliamos a influência dos inibidores de metalopeptidases na expressão desta molécula em *P. boydii*. Os resultados mostraram que Cu^{2+} -fendio foi capaz de inibir drasticamente a expressão de PRM na superfície fúngica. Fendio e Ag^{2+} -fendio também foram capazes de modular negativamente a expressão desta molécula, porém em menor proporção. A 1,10-fenantrolina não alterou de forma significativa a expressão de PRM.

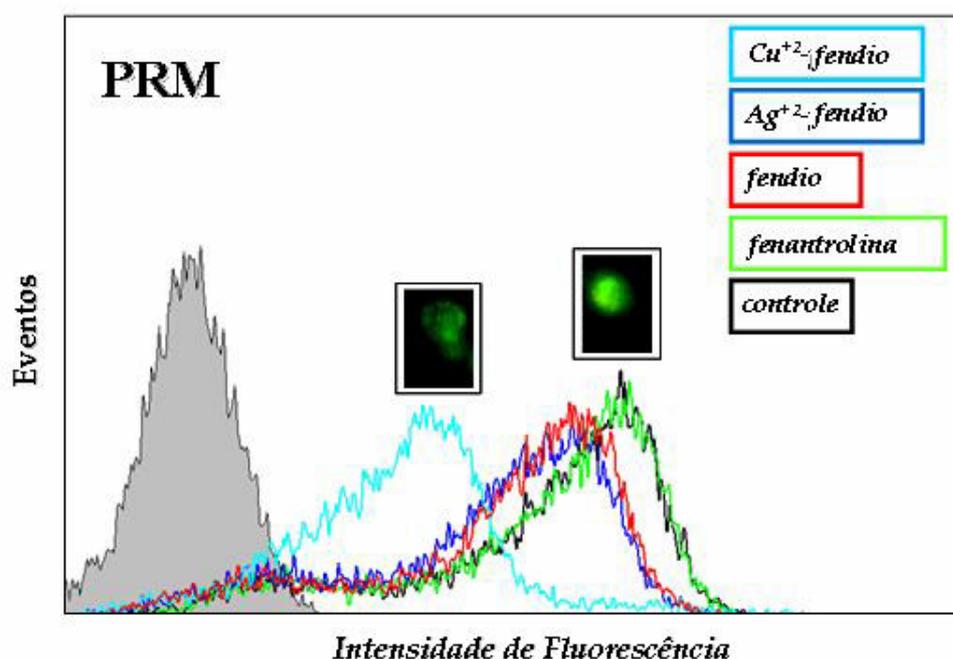


Fig. 18: Modulação da expressão de PRM na superfície de conídios de *P. boydii*, após tratamento com os inibidores de metalopeptidases. O fungo foi crescido em ágar Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. Posteriormente, 1×10^6 conídios foram incubados na presença ou na ausência dos inibidores de metalopeptidases na concentração subinibitória de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ à temperatura ambiente por 16 h. Após o período de incubação, os conídios foram lavados com PBS e incubados com o anticorpo anti-PRM por 1 h. Em seguida, os conídios foram lavados e incubados com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína por 1 h. Finalmente, os conídios foram lavados e analisados em citômetro de fluxo. A autofluorescência corresponde aos conídios incubados apenas com o anticorpo secundário.

► expressão de proteínas ligadoras de fibronectina:

Com o intuito de avaliar se 1,10-fenantrolina e seus derivados seriam capazes de modular a expressão dessas proteínas na superfície de conídios de *P. boydii*, foi realizado um ensaio onde conídios tratados ou não tratados com os inibidores proteolíticos foram colocados para interagir com a fibronectina solúvel. A ligação da fibronectina à superfície fúngica foi avaliada através da incubação com anticorpo anti-fibronectina e, em seguida, analisadas através de citometria de fluxo. Como resultado foi observado que todos os inibidores utilizados foram capazes de diminuir a ligação dos conídios à fibronectina (Fig. 19).

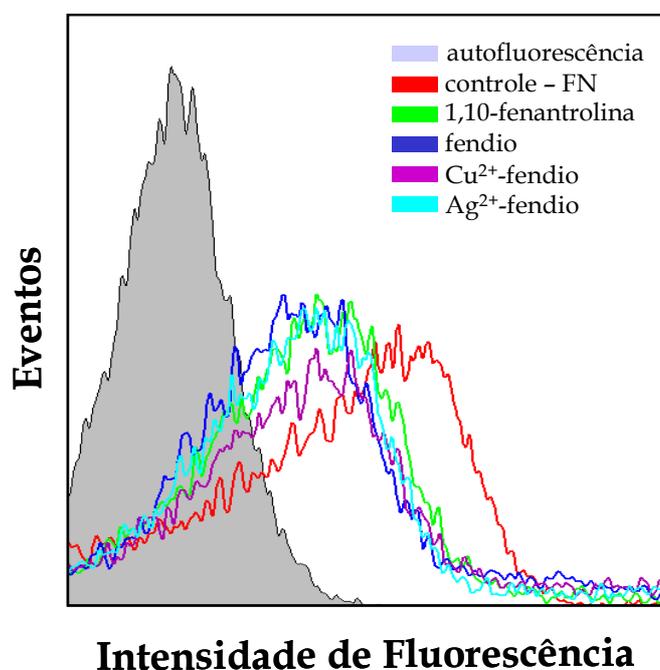


Fig. 19: Modulação da expressão de proteínas ligadoras de fibronectina na superfície de conídios de *P. boydii*, após tratamento com os inibidores de metalopeptidases. O fungo foi crescido em ágar Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. Posteriormente, 1×10^6 conídios foram incubados na presença ou na ausência dos inibidores de metalopeptidases na concentração subinibitória de $0,1 \mu\text{g/ml}$ à temperatura ambiente por 16 h. Após o período de incubação, os conídios foram lavados com PBS e incubados com fibronectina solúvel ($200 \mu\text{g/ml}$) por 1 h. Em seguida, os conídios foram lavados e incubados com anticorpo anti-fibronectina na diluição de 1:100 por 1 h. Os conídios foram novamente lavados e incubados com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína por 1 h. Finalmente, os conídios foram lavados e analisados em citômetro de fluxo. A autofluorescência corresponde aos conídios incubados apenas com o anticorpo secundário.

► **expressão de esteróis:**

ESHWIKA e colaboradores (2004) reportaram que os compostos Cu^{2+} -fendio e Ag^{2+} -fendio modularam a síntese de moléculas de esteróis em leveduras da espécie *C. albicans*. Tendo em vista esse dado, analisamos o efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados na síntese de esteróis em *P. boydii*. Para tanto, conídios de *P. boydii* foram tratados ou não com inibidores proteolíticos e, em seguida, submetidos a um procedimento de extração lipídica com a utilização de solventes orgânicos. As proteínas foram removidas por centrifugação e os lipídios separados pela aplicação de um sistema de partição. O conteúdo de esteróis das amostras foi resolvido por HPTLC. Como resultado foi observado que, comparativamente ao controle (conídios não tratados com os inibidores), a expressão de esteróis foi minimamente aumentada quando as células fúngicas eram submetidas ao tratamento com o inibidor 1,10-fenantrolina. Por sua vez, quando as células foram tratadas com fendio, a expressão de esteróis aumentou quase que o dobro em relação ao controle. Quando as células foram tratadas com o inibidor Cu^{2+} -fendio, observou-se também um aumento na expressão dos esteróis. Este aumento foi menor do que o provocado pelo fendio, ainda que significativo. O tratamento das células com Ag^{2+} -fendio gerou um aumento na quantidade dos esteróis em cerca de 5 vezes com relação ao sistema controle (**Fig. 20**).

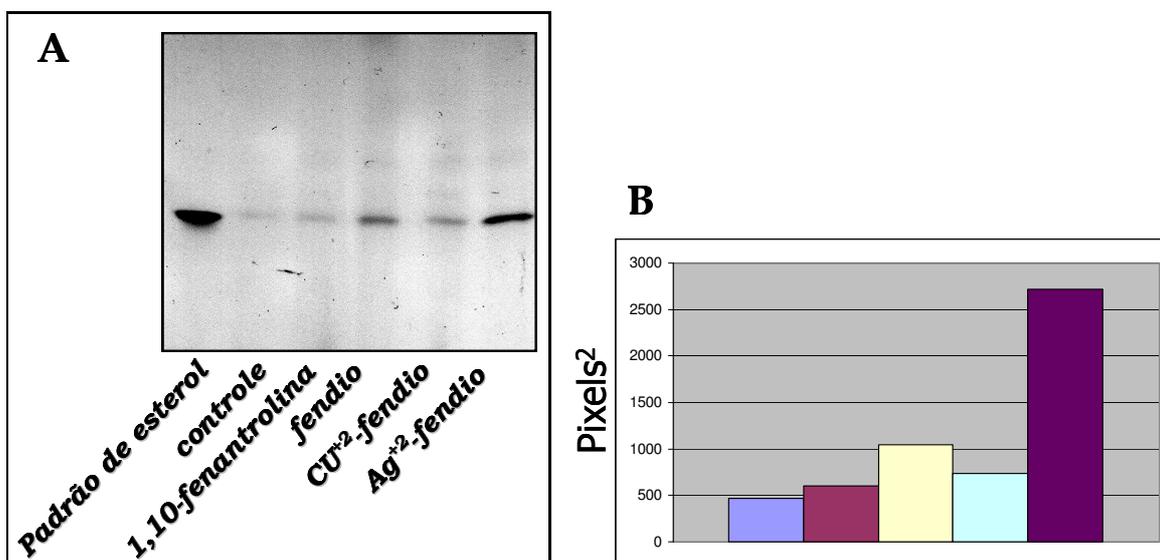


Fig. 20: Cromatografia em camada fina de alta performance (HPTLC) demonstrando a modulação da expressão de esteróis em conídios de *P. boydii*, após tratamento com os inibidores de metalopeptidases. (A) Após crescimento em ágar Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados em tampão PBS e 1×10^7 células foram incubadas na ausência ou na presença dos inibidores de metalopeptidases em concentração subinibitória ($0,1 \mu\text{g/ml}$) à temperatura ambiente por 16 h. Após incubação, os conídios foram lavados com PBS e os lipídios foram extraídos com uma mistura de solventes orgânicos (clorofórmio:metanol 2:1 v/v). As proteínas foram removidas por centrifugação e um sistema de partição foi aplicado de modo a separar os esteróis dos demais lipídios. Sais e contaminantes polares foram removidos por cromatografia de fase reversa para posterior separação de esteróis por HPTLC. **(B)** Densitometria das bandas observadas no HPTLC, após análise pelo software Scion Image (NIH).

4.11) Estudo do efeito aditivo entre os inibidores de metalopeptidases e agentes antifúngicos sobre o crescimento celular de *P. boydii*:

► perfil de susceptibilidade de *P. boydii* à anfotericina B e fluconazol:

Sabe-se que *P. boydii* é um fungo que apresenta resistência à maioria dos antifúngicos utilizados atualmente na clínica médica. Desta forma, avaliamos o perfil de susceptibilidade da cepa HLPB de *P. boydii*, utilizada neste estudo, frente a dois agentes antifúngicos clássicos: anfotericina B e fluconazol. Como esperado para *P. boydii*, observou-se um perfil de resistência a estes dois antifúngicos. Nos sistemas expostos às drogas, a viabilidade celular foi similar à observada no sistema controle, com exceção da anfotericina B na concentração de 100 µg/ml, que foi capaz de causar redução no crescimento celular em aproximadamente 50% (Fig. 21).

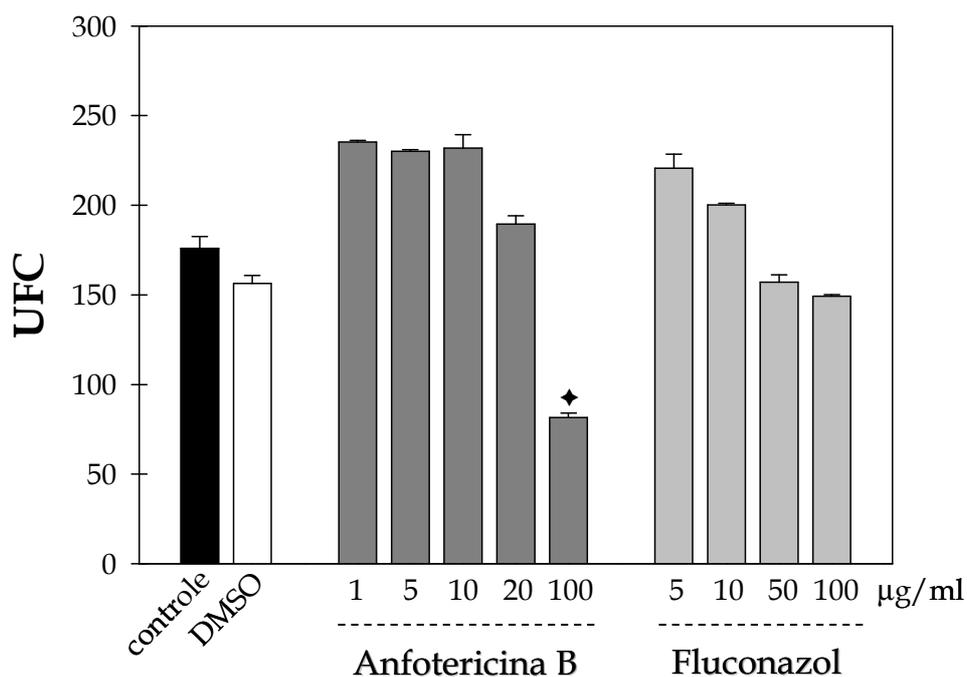


Fig 21: Perfil de susceptibilidade da cepa HLPB de *P. boydii* à ação antifúngica de anfotericina B e fluconazol. O fungo foi crescido em meio Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. Posteriormente, 1×10^3 conídios foram incubados na presença ou na ausência dos antifúngicos em diferentes concentrações (1 – 100 µg/ml) à temperatura ambiente por 16 h. Após o período de incubação, os conídios foram lavados com PBS e incubados em ágar Sabouraud para posterior contagem de UFC. Os sistemas assinalados com o símbolo ♦ apresentaram crescimento significativamente diferente dos conídios não tratados ($P < 0,05$; teste *t* de Student).

► **análise do efeito aditivo:**

Com o objetivo de avaliar um possível efeito aditivo dos inibidores de metalopeptidases e antifúngicos, ambos compostos foram utilizados em concentrações subinibitórias. Assim, os conídios de *P. boydii* foram incubados na ausência ou na presença dos inibidores de metalopeptidases na concentração de 0,001 µg/ml juntamente com a anfotericina B ou com o fluconazol na concentração de 10 µg/ml. Foi observado que tanto a 1,10-fenantrolina quanto seus derivados atuaram em sinergismo com a anfotericina B. A associação entre anfotericina B e 1,10-fenantrolina causou morte de aproximadamente 50% das células. Fendio e Ag²⁺-fendio foram os inibidores, que em conjunto com a anfotericina B, tiveram o maior efeito fungicida, atingindo a faixa de 65% de morte celular. A 1,10-fenantrolina e o fendio não demonstraram, nestas condições, efeito aditivo com o fluconazol. Cu²⁺-fendio e Ag²⁺-fendio, entretanto, atuaram em sinergismo com o fluconazol, provocando morte de aproximadamente 70% das células (**Fig. 22**).

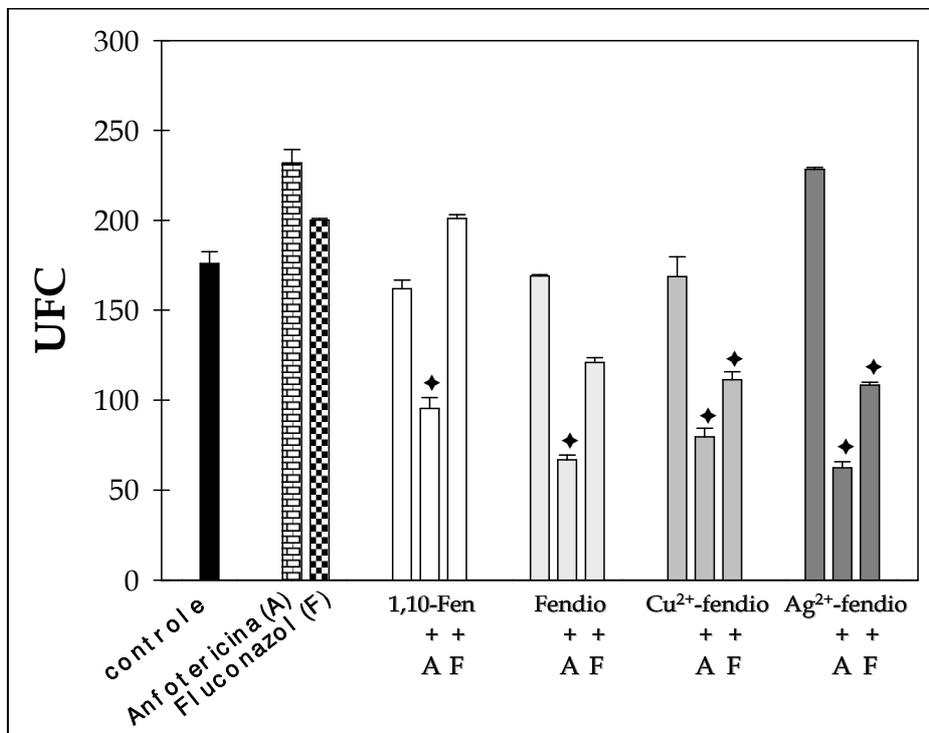


Fig 22: Efeito aditivo de 1,10-fenantrolina e seus derivados com a anfotericina B ou fluconazol. O fungo foi crescido em meio Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. Posteriormente, 1×10^3 conídios foram incubados na presença ou na ausência da 1,10-fenantrolina e seus derivados na concentração subinibitória de $0,001 \mu\text{g/ml}$ associados à anfotericina B ou fluconazol ($10 \mu\text{g/ml}$) à temperatura ambiente por 16 h. Após o período de incubação, os conídios foram novamente lavados com PBS e incubados em ágar Sabouraud para posterior contagem de UFC. Os sistemas assinalados com o símbolo ♦ apresentaram crescimento significativamente diferente dos conídios não tratados ($P < 0,05$; teste t de Student).

4.12) Ensaio de toxicidade de 1,10-fenantrolina e seus derivados em células animais e em camundongos:

► Cálculo do CC₅₀ de 1,10-fenantrolina e seus derivados para diferentes linhagens celulares e para *P. boydii*:

Com o objetivo de verificar o efeito tóxico de 1,10-fenantrolina e seus derivados em diferentes linhagens celulares, procedeu-se um ensaio utilizando-se o corante de viabilidade vermelho neutro. As células aderidas a placas de 96 poços foram colocadas em contato com 1,10-fenantrolina e seus derivados em diferentes concentrações por 20 h. Posteriormente, as células foram lavadas e incubadas com o corante vermelho neutro. O vermelho neutro é um corante de viabilidade que penetra nas células viáveis. Em seguida, as células foram lisadas e a quantificação do vermelho neutro foi feita através de leitor de ELISA. Esse ensaio foi realizado com células transformadas e células primárias. Como podemos observar na **Tabela 3**, o CC₅₀ calculado para as células foi sempre superior ao CC₅₀ calculado para os conídios de *P. boydii*. O inibidor 1,10-fenantrolina se mostrou o menos tóxico para as células hospedeiras uma vez que o CC₅₀ para este composto foi superior a 10 µg/ml para todas as células testadas.

Tabela 3: CC₅₀ dos inibidores de metalopeptidases para diferentes linhagens de células e para conídios de *P. boydii*.

Células	1,10-fenantrolina	fendio	Cu²⁺-fendio	Ag²⁺-fendio
C6/36	> 10	> 10	> 10	> 10
Vero	> 10	6,6	6,5	> 10
MA-104	> 10	3,9	4,4	7,3
LLC-MK2	> 10	7,4	6,8	9,1
HEp2	> 10	8,8	> 10	> 10
CHO	> 10	7,9	9,2	> 10
A549	> 10	8,5	8,2	> 10
RAW	> 10	5,6	6,1	> 10
MØ*	> 10	> 10	> 10	> 10
MRC-5*	> 10	0,76	0,76	7,4
Conídios	0,473	0,032	0,096	0,116

C6/36 = Célula de mosquito *Aedes albopictus*

Vero = Célula de rim de macaco

MA-104 = Célula embrionária de rim de macaco *Rhesus*

LLC-MK2 = Célula de rim de macaco *Rhesus*

HEp2 = Célula de carcinoma de laringe humana

CHO = Célula de ovário de hamster chinês

A549 = Célula epitelial pulmonar humana

RAW = Macrófagos murinos

MØ = Macrófagos de camundongo

MRC-5 = fibroblasto de pulmão humano

(*) Células primárias. As células não assinaladas representam linhagens estabelecidas.

► **Ensaio de toxicidade aguda de 1,10-fenantrolina e seus derivados em camundongos suícos albinos:**

A toxicidade dos inibidores proteolíticos foi determinada através de injeções intraperitoneais dos compostos em diferentes concentrações e posterior acompanhamento dos animais durante 7 dias consecutivos. Neste ensaio os inibidores foram utilizados em concentrações que variaram entre 15 e 450 mg/Kg de peso do animal. Como podemos observar na **Tabela 4**, até a concentração de 45 mg/Kg os inibidores não levaram os camundongos ao óbito. Ao contrário, a concentração máxima utilizada neste estudo (450 mg/Kg) resultou na morte de todos os animais nas primeiras 24 h, a qual era precedida de convulsões, poucos minutos após a injeção dos inibidores. A 1,10-fenantrolina e o Ag^{2+} -fendio se mostraram os compostos menos tóxicos, uma vez que 1,10-fenantrolina não levou nenhum camundongo a morte até a concentração de 300 mg/Kg e o Ag^{2+} -fendio foi responsável pela morte de 40% dos animais nesta concentração. O fendio e o Cu^{2+} -fendio se mostraram os mais tóxicos, apresentando uma taxa de mortalidade de 80% na concentração de 150 mg/Kg. Não foram observadas mortes nos sistemas com os camundongos controle (injetados com PBS) e nos camundongos onde foram injetados apenas DMSO até 7 dias após a inoculação.

Tabela 4: Porcentagem de morte de camundongos suícos albinos quando administrados com 1,10-fenantrolina e seus derivados em diferentes concentrações.

Horas depois do tratamento	Compostos / concentração	% de Mortalidade						mg/Kg
		15	30	45	150	300	450	
24 h	1,10-fenantrolina	0	0	0	0	0	100	
	Fendio	0	0	0	0	80	100	
	Cu ²⁺	0	0	0	0	100	100	
	Ag ²⁺	0	0	0	0	40	100	
72 h	1,10-fenantrolina	0	0	0	0	0	-	
	Fendio	0	0	0	20	80	-	
	Cu ²⁺	0	0	0	60	-	-	
	Ag ²⁺	0	0	0	0	40	-	
168 h	1,10-fenantrolina	0	0	0	0	0	-	
	Fendio	0	0	0	80	80	-	
	Cu ²⁺	0	0	0	80	-	-	
	Ag ²⁺	0	0	0	0	40	-	

► **Ensaio de toxicidade crônica de 1,10-fenantrolina e seus derivados em camundongos suíços albinos:**

Para o ensaio de toxicidade crônica, grupos de camundongos foram submetidos a injeções intraperitoneais com os inibidores proteolíticos na concentração de 45 mg/Kg, diariamente, durante 5 dias consecutivos. Posteriormente, os camundongos foram monitorados durante 7 dias consecutivos. Não foram observados óbitos durante o período do ensaio. Após os 7 dias, colheu-se o soro dos camundongos para posterior dosagem de duas das principais enzimas hepáticas: a aspartato aminotransferase (TGO) e a alanina aminotransferase (TGP), para que fosse avaliado algum possível dano hepático causado pelos inibidores. Os resultados mostraram que os níveis de atividade dessas duas enzimas nos sistemas tratados com os inibidores estavam em níveis comparáveis ao sistema controle (Fig. 23).

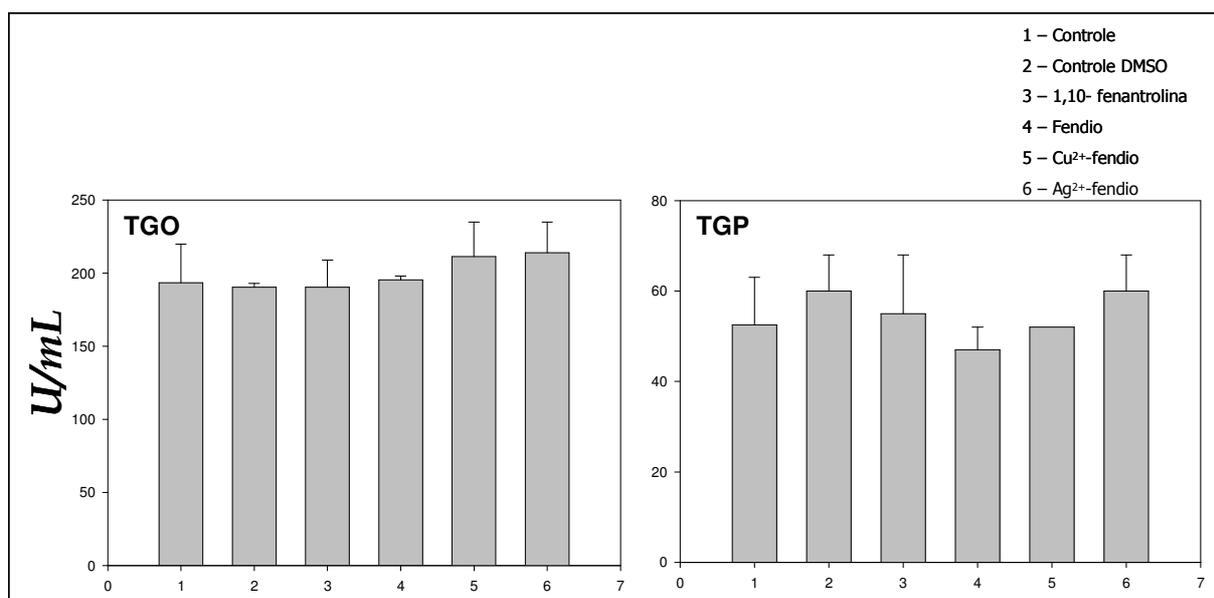


Fig 23: Dosagem da atividade de aspartato aminotransferase (TGO) e alanina aminotransferase (TGP) de camundongos suíços albinos, tratados ou não tratados com 1,10-fenantrolina e seus derivados. Camundongos suíços albinos receberam injeção intraperitoneal diariamente durante 5 dias consecutivos com os inibidores proteolíticos na concentração de 45 mg/Kg. Após 7 dias de acompanhamento, nenhum óbito foi observado e os soros dos animais foram colhidos e utilizados para dosagem das enzimas hepáticas.

► PARTE II: Detecção de moléculas ligadoras de fibronectina em *P. boydii*:

4.13) Ensaios de ELISA e citometria de fluxo:

Como exposto anteriormente, conídios de *P. boydii* demonstraram capacidade de se ligar à fibronectina. Dessa forma, passamos a investigar a ocorrência de moléculas mediadoras da interação entre o fungo e fibronectina solúvel usando diferentes abordagens experimentais. Para ensaios de ELISA, a fibronectina solúvel foi adsorvida a uma placa de 96 poços em diferentes concentrações. O resultado mostrou que a ligação dos conídios de *P. boydii* à fibronectina é dependente da concentração da proteína. Essa ligação pareceu ser específica, uma vez que os conídios aderiram à BSA em níveis reduzidos, quando comparados aos dados obtidos com fibronectina (**Fig. 24A**).

Em ensaios de citometria de fluxo, os conídios foram incubados com concentrações crescentes (25 a 200 µg/ml) de fibronectina humana por 1 h. Reforçando os dados obtidos por ELISA, observamos que a ligação à fibronectina foi dose-dependente (**Fig. 24B**).

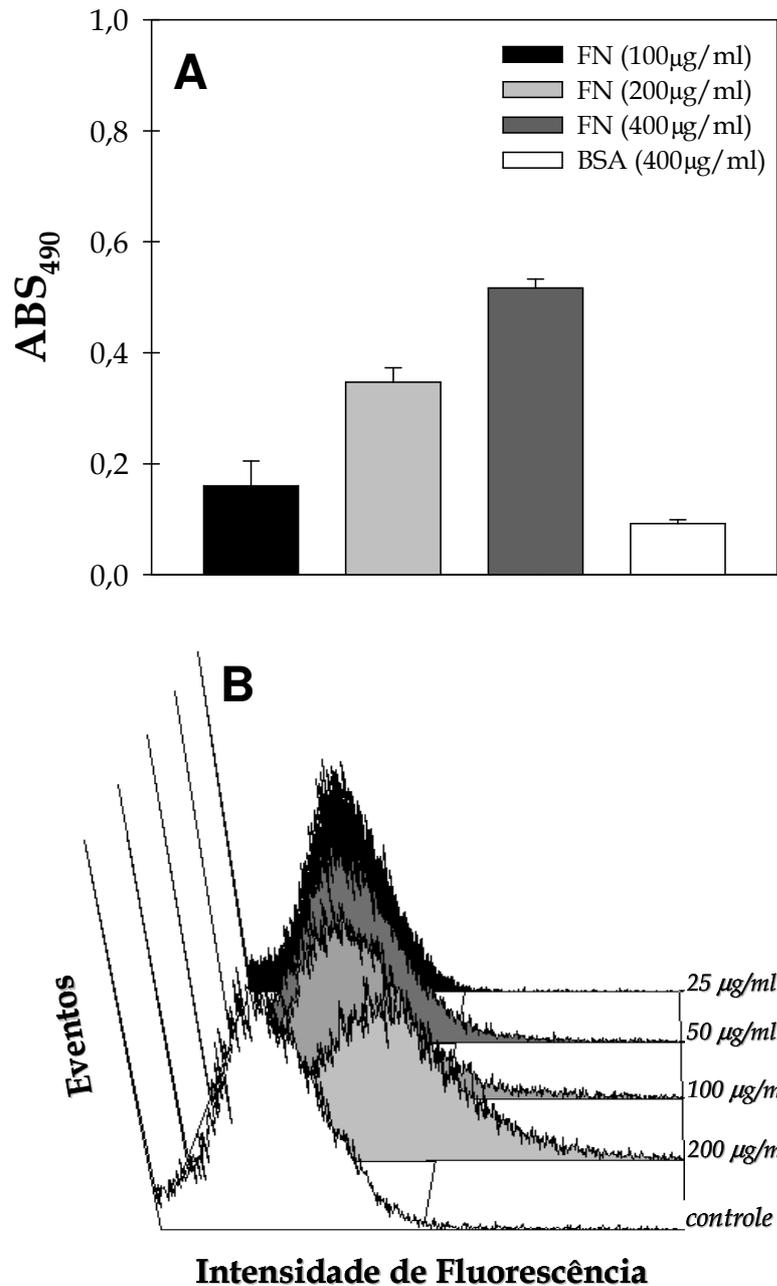


Fig. 24: ELISA e citometria de fluxo mostrando a ligação dos conídios de *P. boydii* à fibronectina humana. O fungo foi crescido em ágar Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. **(A)** Incubação dos conídios com fibronectina imobilizada. As absorvâncias foram mensuradas em leitor de ELISA. **(B)** Incubação dos conídios com fibronectina solúvel. As reações de fluorescência foram quantificadas em citômetro de fluxo. A autofluorescência (histograma em branco) corresponde aos conídios incubados apenas com o anticorpo secundário.

4.14) Ensaios de imunofluorescência, imunoblotting e imunocitoquímica:

Para verificar a existência de proteínas ligadoras de fibronectina em micélio e conídio de *P. boydii*, extratos protéicos foram analisadas por “Western blotting”. A presença das proteínas ligantes de fibronectina foi evidenciada após incubação das membranas de nitrocelulose, contendo os extratos celulares, com fibronectina solúvel, seguida de revelação com anticorpo anti-fibronectina. Nos dois extratos, foram observados seis polipeptídeos capazes de se ligarem à fibronectina com massas moleculares aparentes variando de 55 a 17 kDa (**Fig. 25A**). Por microscopia de fluorescência, concluímos que a ligação da fibronectina à superfície celular se dá de forma homogênea (**Fig. 25B**).

Para que fosse possível visualizar a distribuição das proteínas ligadoras de fibronectina nos diferentes compartimentos celulares de conídios de *P. boydii*, foi realizado um ensaio imunocitoquímico utilizando a fibronectina solúvel e anticorpo anti-fibronectina. Os resultados indicaram a presença de proteínas ligadoras de fibronectina ao longo de toda a extensão da parede celular do fungo, assim como no citoplasma, em estruturas semelhantes a vesículas intracelulares (**Fig. 25C**).

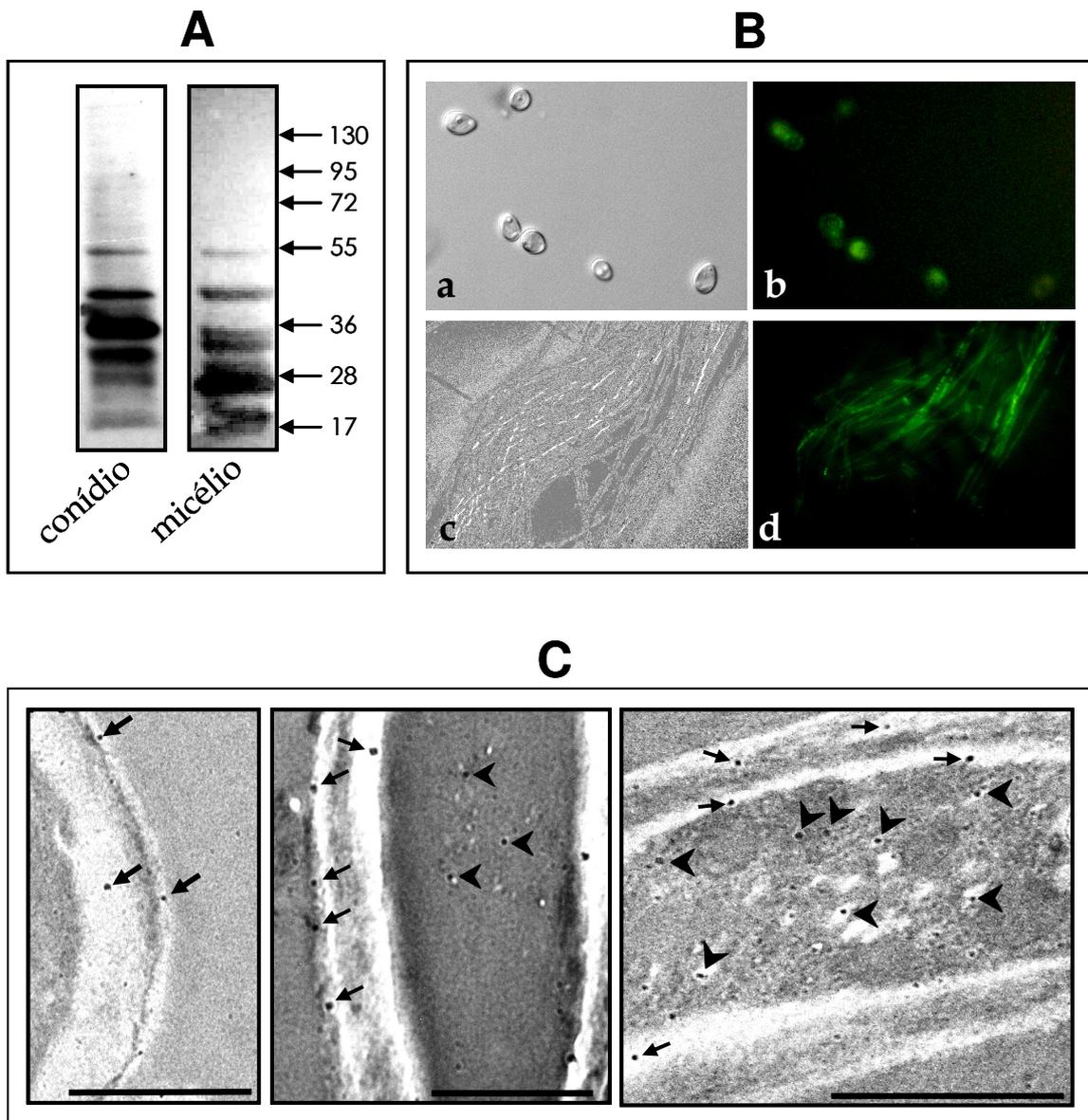


Fig. 25: Imunoblotting, microscopia de fluorescência e imunocitoquímica mostrando a ligação de fibronectina humana a conídios e micélio de *P. boydii*. (A) Detecção de proteínas ligadoras de fibronectina no extrato de conídio e micélio de *P. boydii* por Western blotting. Os números à direita se referem às massas moleculares de proteínas padrões, expressos em kilodalton (kDa). (B) Microscopia de fluorescência mostrando a ligação da fibronectina solúvel a conídios (a, microscopia de contraste de fase; b, microscopia de fluorescência) e micélio (c, microscopia de contraste de fase; d, microscopia de fluorescência) de *P. boydii*. (C) Localização imunocitoquímica das proteínas ligadoras de fibronectina em conídios de *P. boydii*. A marcação é evidente em compartimentos intracelulares (cabeça de seta) e parede celular do fungo (seta). Barras: 4 μ M.

4.15) Importância da ligação à fibronectina na interação de conídios de *P. boydii* com células hospedeiras:

Com a finalidade de inferir uma função às proteínas ligadoras de fibronectina presentes na superfície de conídios de *P. boydii*, ensaios de interação do fungo com células hospedeiras foram realizados na presença de fibronectina solúvel ou anticorpo anti-fibronectina. Os resultados demonstraram que quando os conídios eram tratados com a fibronectina solúvel os índices de associação diminuía significativamente para as duas linhagens testadas, A549 e MRC-5. Resultados semelhantes foram obtidos quando as células hospedeiras foram tratadas com anticorpo anti-fibronectina. Foi observado também que a inibição da associação é um fator dependente da concentração tanto de fibronectina solúvel quanto do anticorpo anti-fibronectina. Conídios tratados com BSA e células tratadas com anticorpo irrelevante não alteraram significativamente os índices de associação em relação ao controle (**Fig. 26**).

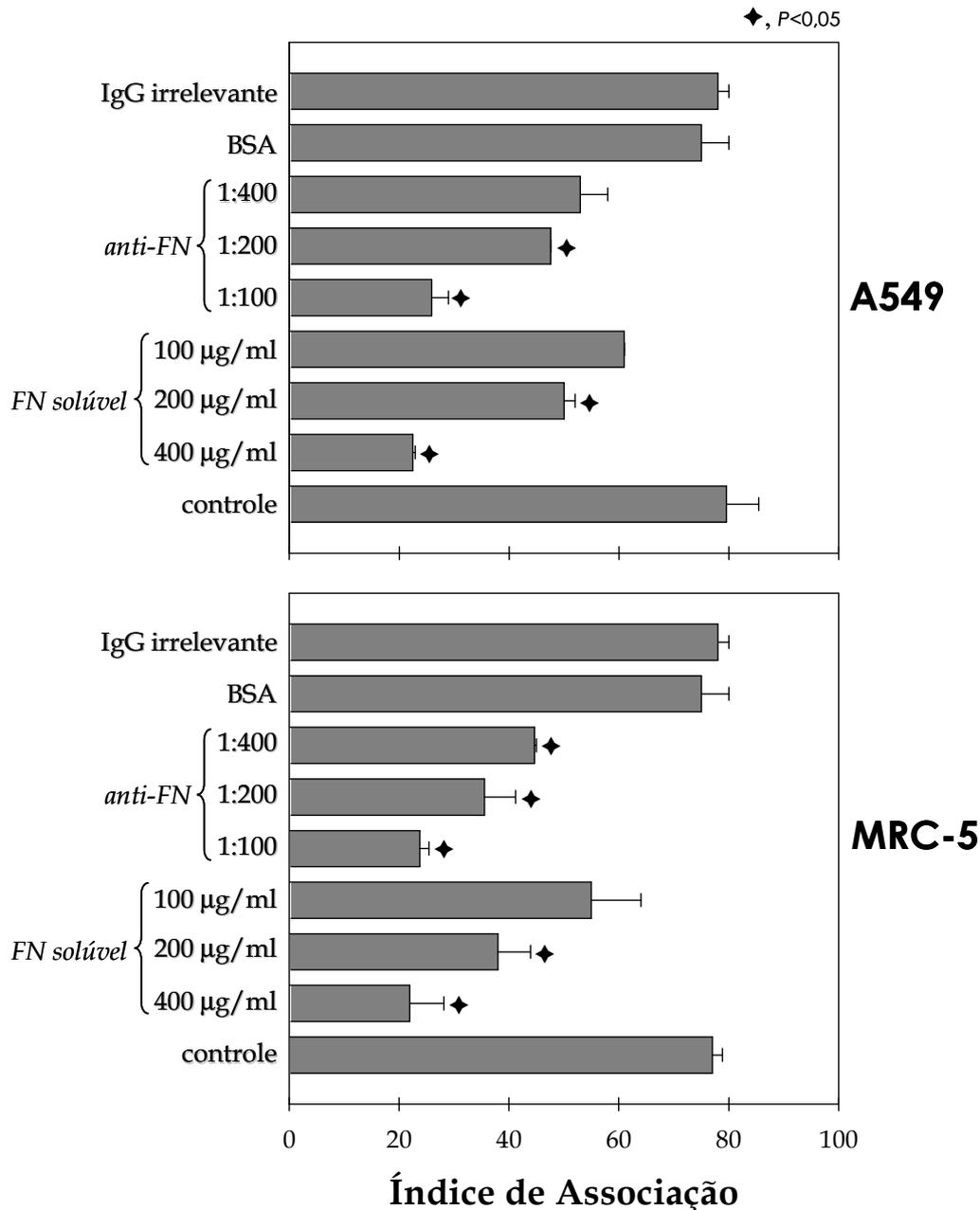


Fig. 26: Efeito da ligação à fibronectina na interação de conídios de *P. boydii* com células hospedeiras. O fungo foi crescido em ágar Sabouraud por sete dias; em seguida, os conídios foram colhidos, lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. Posteriormente, os conídios foram incubados na presença ou na ausência da fibronectina humana solúvel em diferentes concentrações (100 - 400 µg/ml) ou com BSA solúvel (400 µg/ml) à temperatura ambiente por 1 h. Alternativamente, as células hospedeiras (A549 e MRC-5) foram incubadas com anticorpo anti-fibronectina nas diluições de 1:100, 1:200 e 1:400 ou com IgG irrelevante (1:400) por 1 h a 37°C em estufa de CO₂. Após o período de incubação, os conídios e as células foram lavados e adicionados a poços revestidos por monocamadas das linhagens em estudo na proporção de 10 conídios para cada célula hospedeira. Após o período de interação, os sistemas foram lavados e corados pelo método de Giemsa para posterior determinação dos índices de associação. Índices de associação significativamente diferente dos sistemas controles são assinalados com ◆ ($P < 0,05$; teste *t* de Student).

► PARTE III: Análise proteômica de moléculas secretadas por *P. boydii*

4.16) Perfil de proteínas e identificação de proteínas antigênicas secretadas por *P. boydii*:

O procedimento de obtenção de sobrenadante de micélio em meio PBS-glucose foi repetido 4 vezes e os sobrenadantes obtidos foram concentrados 100× em sistema AMICON. Os sobrenadantes foram então combinados, resultando em um único sobrenadante chamado de sobrenadante final (SF), o qual foi utilizado em todas as etapas deste estudo.

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida foi realizada no intuito de observar o perfil protéico dos diferentes sobrenadantes e do SF. O resultado revelou que os perfis de proteínas secretadas observados em cada sobrenadante se manteve bastante conservado, com sutis alterações quantitativa e qualitativas, sendo composto de proteínas com massas moleculares variando de 116 a 15 kDa (**Fig. 27**).

Em um trabalho anterior de nosso grupo (AOR, 2009), foi obtido um soro hiperimune de coelho contra as proteínas secretadas por micélio de *P. boydii*. Com a finalidade de identificar proteínas secretadas com caráter antigênico em formas micelianas de *P. boydii*, a reatividade da fração extracelular obtida em PBS condicionado foi testada com este soro hiperimune. Através de Western blotting, observamos a presença de várias proteínas reconhecidas pelo soro hiperimune de coelho, com massas moleculares variando entre 116 e 20 kDa (**Fig. 27**). O resultado com soro pré-imune obtido do mesmo coelho foi negativo (dado não mostrado). Análises similares com anticorpos presentes no soro de paciente com pseudallescheriose revelaram um perfil similar de detecção de antígenos protéicos, também com massas moleculares variando entre 116 e 20 kDa (**Fig. 27**). Em contrapartida, nenhuma banda reativa foi observada quando foi usado soro de um indivíduo sadio (dado não mostrado). Estes resultados comprovam que o micélio de *P. boydii* é capaz de secretar proteínas antigênicas.

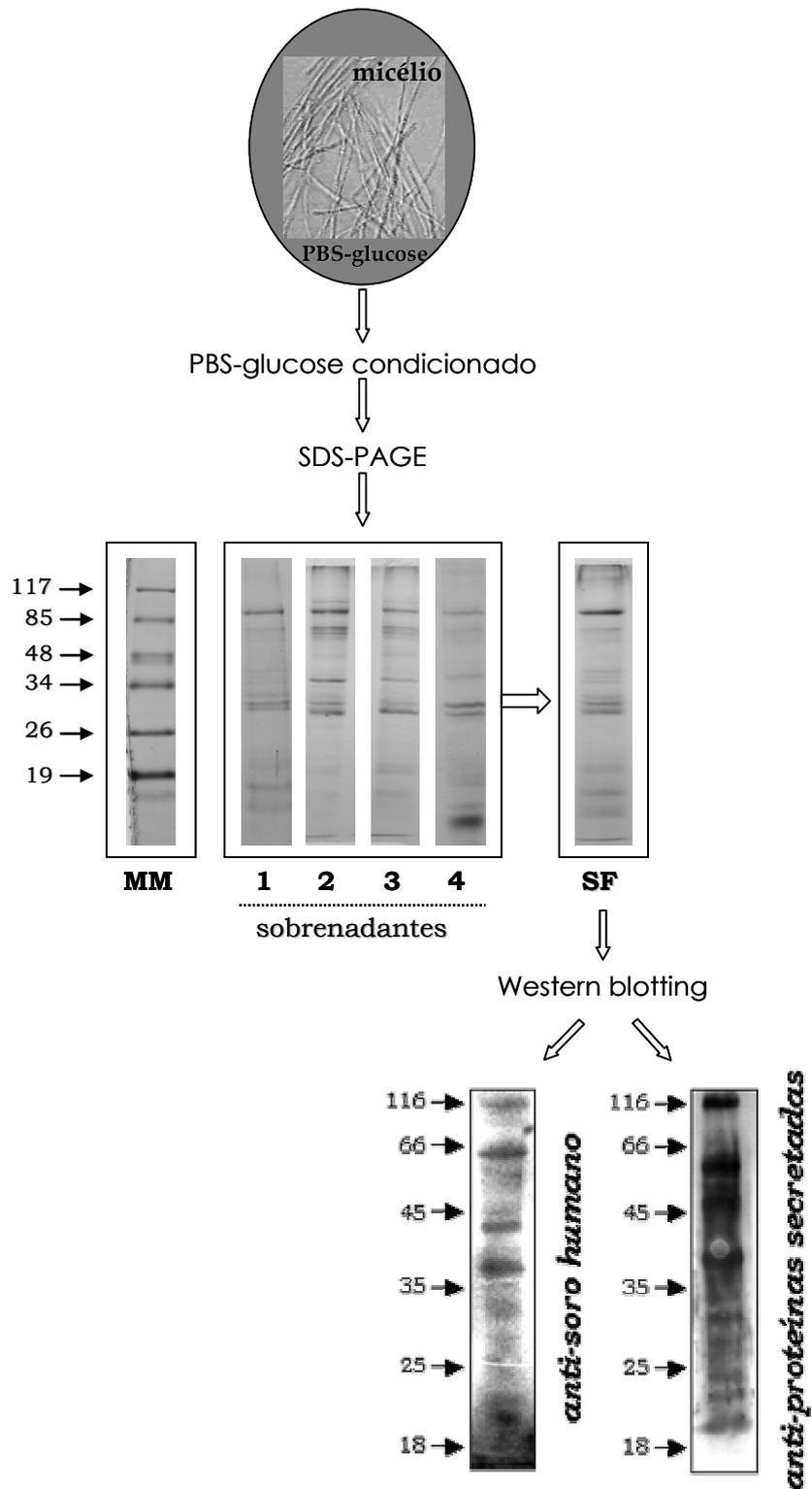


Fig. 27: Perfil de proteínas e identificação de proteínas antigênicas secretadas por *P. boydii*: SDS-PAGE mostrando o perfil protéico dos diferentes sobrenadantes (1, 2, 3 e 4), obtidos em quatro diferentes experimentos, e do sobrenadante final (SF). A análise por Western blotting mostra o perfil de proteínas antigênicas presentes no SF. As membranas foram incubadas com soro humano de um paciente com pseudallescheriose e com o soro do coelho imunizado com o SF.

4.17) Ensaio de confirmação da viabilidade do micélio utilizado no experimento de secreção:

Com o objetivo de confirmar se as formas de micélio utilizadas no experimento de secreção apresentavam níveis máximos de viabilidade, análises por microscopia de fluorescência foram realizadas. As formas micelianas preparadas nas condições utilizadas nos testes de secreção foram, como esperado, coradas com calcofluor, mas não com PI, provando assim que a incubação nessas condições não induziu perda da viabilidade celular (**Figs. 28 a, b**). Em contrapartida, células mortas por autoclavação apresentaram intensa coloração com os dois corantes fluorescentes, validando assim o método utilizado para nossas análises (**Fig. 28 c, d**).

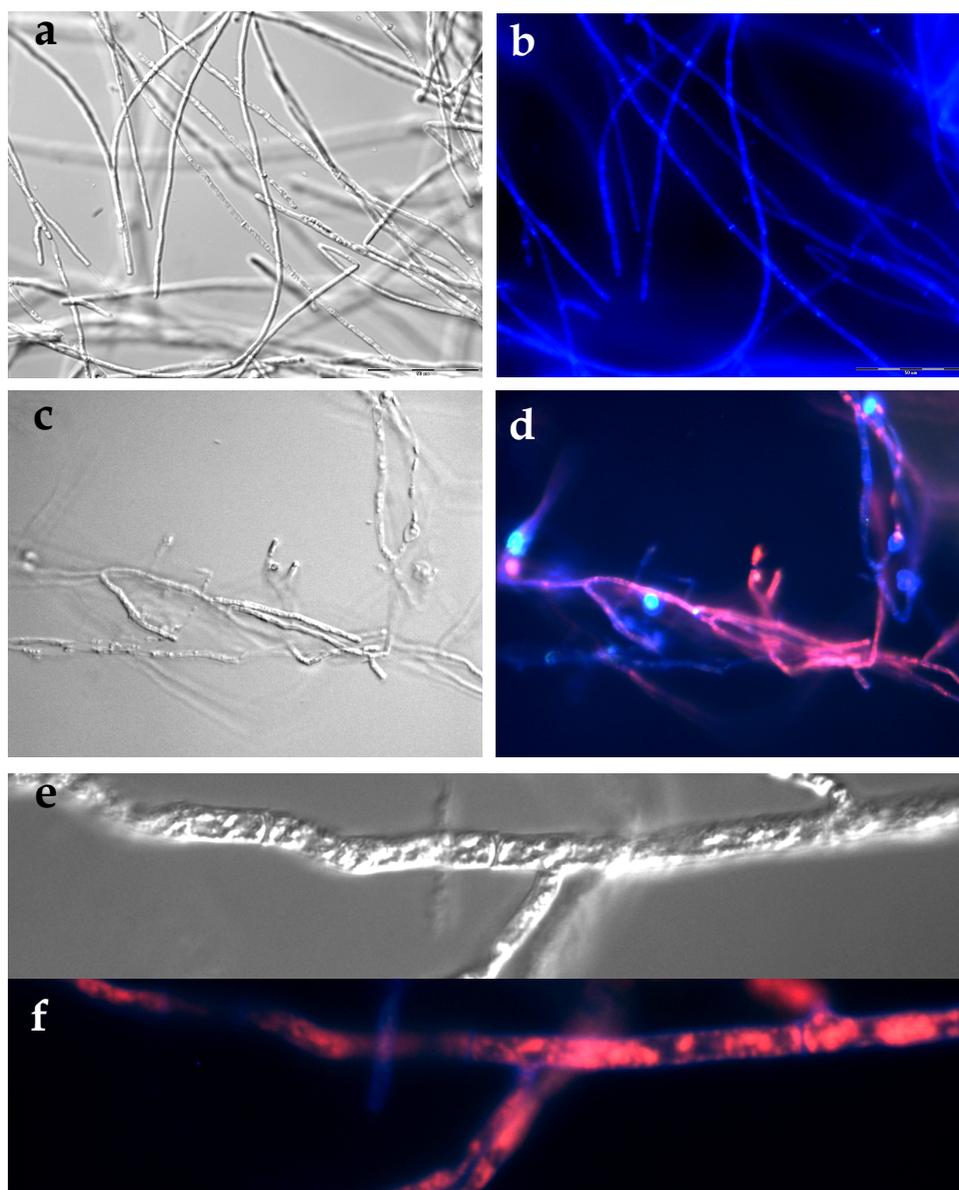


Fig. 28: Microscopia de fluorescência para confirmar a viabilidade de células de micélio utilizado no experimento de secreção. Células obtidas nas condições utilizadas para os ensaios de secreção (a-b), além de hifas mortas por autoclavagem (c-f), foram incubadas com calcoflúor e com iodeto de propídio (PI). Houve coloração das células mortas, mas não da preparação controle, com PI, garantindo assim a alta viabilidade nos ensaios de secreção. As imagens em (a), (c) e (e) mostram as células fúngicas por contraste interferencial, enquanto os painéis (b), (d) e (f) mostram as imagens correspondentes no modo de fluorescência. Aumento de 40× (a-d) e aumento de 100× (e, f).

4.18) Eletroforese bidimensional das proteínas secretadas pelo micélio de *P. boydii*:

A separação bidimensional das proteínas secretadas de *P. boydii* foi realizada primeiramente na faixa de pH de 3 a 10. De um modo geral observou-se um maior número de spots na faixa ácida de pH (dados não mostrados). A fim de melhorar a resolução dos spots nessa faixa, foram realizadas separações bidimensionais utilizando faixas de pH entre 3 e 6 e 4 e 7. Foi possível a detecção de mais de 50 spots com massas moleculares variando de 80 a 14 kDa (Fig 29).

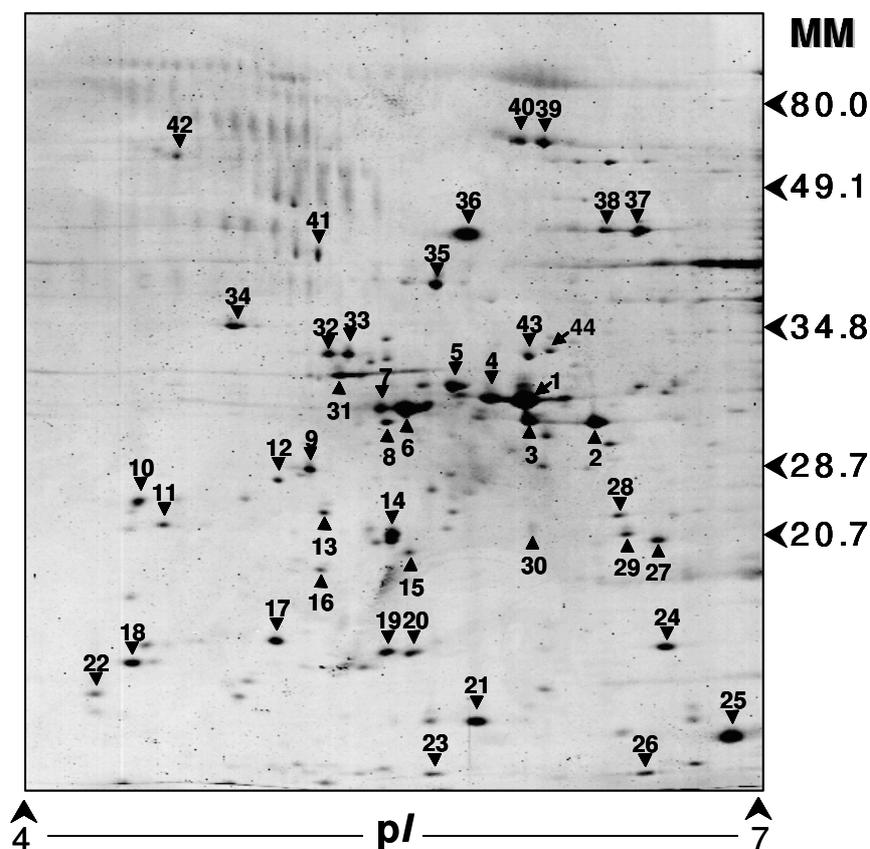


Fig. 29: Eletroforese bidimensional das proteínas secretadas pelo micélio de *P. boydii*. Os números à direita correspondem às massas moleculares de proteínas padrões, expressos em kilodalton. Quarenta e quatro spots foram escolhidos aleatoriamente para a identificação através de espectroscopia de massa.

4.19) Identificação dos spots através de espectrometria de massa:

Um total de 44 spots foram excisados manualmente a partir do gel bidimensional do secretoma do micélio de *P. boydii* e analisados por MALDI-TOF. Desse conjunto, 22 proteínas foram identificadas (Tabela 5). Dentre as proteínas identificadas encontramos proteínas da via glicolítica (triosefosfato isomerase, malato desidrogenase, frutose-1,6-bisfosfato, aldolase, fosfoglicerato mutase), proteínas associadas ao citoesqueleto (dineína e cofilina) e outras proteínas importantes para o metabolismo fúngico (aspártico peptidase, permease, fosfatase, esteróide 5- α -redutase, aspartato semi-aldeído desidrogenase, fosfomanumutase, proteína quinase, manitol-1-fosfato-desidrogenase).

Tabela 5: Identificação das proteínas excisadas do gel bidimensional do secretoma de *P. boydii*:

Número do Spots	Sequência dos peptídeos (massas moleculares)	Prováveis identificações	Microrganismos
1	D/NGADQTTEVQGTIVR (1638.57 Da)	cadeia pesada da dineína	<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10
2	HYI/LVTQR (1731.77 Da) HEI/LGSASAEETYAFEEQE (2946.04 Da)	esteróide 5- α -redutase aspartato semialdeído desidrogenase	<i>Candida albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>
3	TI/LHNF (963.41 Da) I/LGETY (1304.6 Da) NNDYEI/LYEDSR (1416.48 Da) I/LPVTI/LI/LMI/LDI/LI/LSR (1482.71 Da) DTICLFDVDGTLTPAR (1792.72 Da) QVWEPYQEFVNFCI/LR (2013.82 Da)	fosfomanomutase	<i>Neurospora crassa</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>
4, 5	FFVGGNFK (914.44 Da) KFFVGGNFK (1042.49 Da) VATTEQAQEVHAAIR (1622.75 Da) SQISDWSNIVIAIYEPIWAIGTGK (2561.13 Da) DAGLNWTIIGHSER (1567.69 Da)	triosefosfato isomerase	<i>Aspergillus fumigatus</i>
6	EVDQEFTGESI/LI/LSEFVGQNFNR (2615.18 Da)	fosfatase/fosfohexomutase	<i>Chaetomium globosum</i>
7	QAPTI/LSSPGYI/LF(?) (1611.77 Da) QWAGGNANFNDG (2851.24 Da)	subunidade β 2 da proteína ligadora de nucleotídeo guanina	<i>Candida glabrata</i>
8	SAYGI/LI/LATEVAVNPK (1781.86 Da) I/LVPI/LGFGI/LR (970.59 Da)	domínio de troca de nucleotídeo guanina do fator de elongação 1 β	<i>Aspergillus oryzae</i>
9	DI/LI/LSGDEPESDS (537.35 Da) DI/LI/LSGDEI/LI/LSDS (537.35 Da)	variante I da proteína de tumor controlada traducionalmente	<i>Madurella mycetomatis</i>
10	DVEAEADQTLR (1885.93 Da) EAI/LQR (1787.85 Da)	proteína quinase dependente de ciclina	<i>Aspergillus oryzae</i>
11	I/LTMI/LAWS (1761.86 Da) YAVYDMEYQI/LASGDGI/LR (1965.89 Da) TR(?)SGAAVAQECCI/LTAYNDI/LK (2066.93 Da)	cofilina	<i>Gibberella zeae</i> , <i>Magnaporthe grisea</i>

12	V(?)G(?)Y(?)D(?)QGFDDASR (1486.62 Da) FPTQGNL/LPK (1000.53 Da) QSGEGGNTR (890.53Da) I/LSGEGGNTR (1793.80 Da) MI/LFQEMI/LGEI/LVDI/L (1940.94 Da)	sem identificação	
13	YDQGFDDASR (1486.69 Da)	proteína hipotética SNOG 13722 (domínio da família cerato-platanina)	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15
14	I/LSNNI/LYR (1216.65 Da)	permease	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40
15	MS de baixa qualidade		
16	MS de baixa qualidade		
17	NI/LEAVI/LTEAGS (1559.85 Da)	sem identificação	
18	YAIIVDHGK (1000.57 Da) EVDPGI/LAI/LTGAEAVI/LAR (1680.98 Da)	homólogo à proteína hipotética MGG_02710, relacionada à família peroxiredoxina	<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15
19 – 24	MS de baixa qualidade		
25	VGEIYPWSSWK (1451.77 Da)	homólogo à proteína hipotética MGG_05974, relacionada ao desenvolvimento de micélio	<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15
26	LFGVTLDIVR (1232.78 Da) DDLFNINAGIVK (1317.75 Da) DADIIVIPAGIPR (1348.83 Da) AVVAGASGGIGQPLSLLK (1750.09 Da)	malato desidrogenase	<i>Gibberella zeae</i> PH-1, <i>Neurospora crassa</i> OR74A
27, 28	LLPWLDGMLDEDER (1700.87) EASVAGAI/LAAAHFI/LR (1482.9)	frutose-1,6-bisfosfato aldolase	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293, <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
29	IVPAQDPNSGLDVK (1451.81 Da)	manitol-1-fosfato-5-desidrogenase	<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15
30	YAHVTFFFNGGVEK (1615.83 Da)	fosfoalicerato mutase	<i>Podospora anserina</i>
31 – 33	MS de baixa qualidade		
34 35 – 41	FANSENANLFK (1253.63 Da) MS de baixa qualidade	proteína 1 ativada por GTPase ran	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624
42	FDGILGLGYDTISVNR (1738.94 Da)	aspártico peptidase	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
43	MS de baixa qualidade		
44	GLIGPIISR (924.63Da) GDFRIDVGR (948.52 Da) TILGATNPLASAPGTIR (1652.01 Da) R(ou GV)MEQTFIAIKPDGNI/LR ou SASEQTFIAIKPDGVQR (1888.05 Da)	nucleosídeo difosfato quinase	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293, <i>Ajellomyces capsulatus</i> NAm1

4.20) Confirmação da presença das enzimas identificadas no secretoma de *P. boydii*:

Como o genoma de *P. boydii* ainda não foi sequenciado, foi necessário validar experimentalmente as sequências obtidas na análise proteômica. Dessa forma, algumas das atividades enzimáticas descritas na **Tabela 5** foram avaliadas por métodos bioquímicos. Em função de aspectos relacionados à maior viabilidade experimental, foram selecionadas as enzimas adenilato quinase, manitol 1,5-fosfato desidrogenase, triosefosfato isomerase, malato desidrogenase, aldolase e aspártico peptidase. De fato, todas essas enzimas foram detectadas por métodos bioquímicos no sobrenadante de *P. boydii* (**Fig. 30**). A aspártico peptidase presente no secretoma de *P. boydii* foi capaz de hidrolisar o substrato específico para a família das peptidases do tipo renina, mas não o substrato para a aspártico peptidase do HIV (**Fig. 30B**).

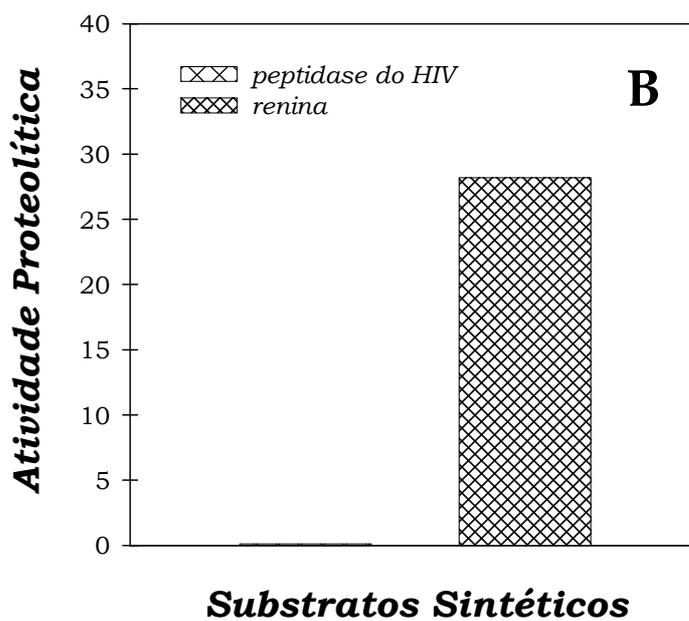
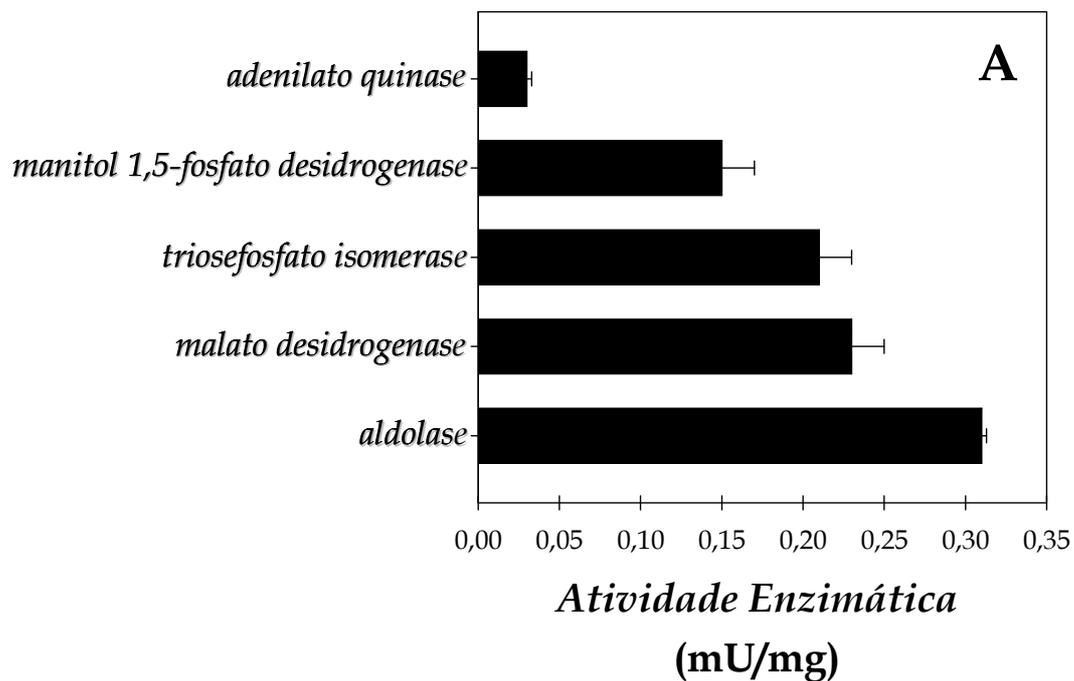


Fig. 30: Confirmação da presença das enzimas identificadas no secretoma de *P. boydii*. Dosagem química para a detecção das enzimas adenilato quinase, manitol 1,5-fosfato desidrogenase, triosefosfato isomerase, malato desidrogenase e aldolase (A) e aspártico peptidase (B), conforme descrito em Material e Métodos.

Discussão

5) DISCUSSÃO

Apesar da crescente importância de *P. boydii* como agente de micoses sistêmicas graves, existem poucos grupos estudando os vários aspectos da bioquímica e biologia celular neste fungo, o que limita expressivamente o conhecimento sobre mecanismos de patogenicidade e alternativas terapêuticas (SANTOS *et al.*, 2009). Sabe-se, entretanto, que *P. boydii* é um fungo altamente resistente à maioria dos antifúngicos atualmente utilizados na clínica médica (CORTEZ *et al.*, 2008). Sendo assim, a caracterização de moléculas com potencial envolvimento na patogênese podem ser alternativas interessantes para o desenho de novos compostos com potencial ação antifúngica (SANTOS *et al.*, 2009).

A secreção de peptidases para o meio extracelular funciona como um mecanismo adaptativo importante durante o ciclo de vida dos fungos (MYOSHI & SHINODA, 2000). No gênero *Pseudallescheria* essas enzimas podem estar diretamente envolvidas na clivagem de nutrientes exógenos para suprir o metabolismo energético, assim como pode atuar diretamente em diferentes etapas da relação fungo-hospedeiro. Nesse contexto, nosso grupo demonstrou que metalopeptidases secretadas por *P. boydii* foram capazes de degradar proteínas séricas humanas, como soro albumina e IgG, além de componentes presentes na matriz extracelular, como fibronectina e laminina e proteínas sialiladas, como a mucina. Acreditamos que, devido ao amplo espectro de clivagem de substratos protéicos, essas metalopeptidases possam ajudar o fungo no escape do sistema imunológico e na disseminação do mesmo no organismo hospedeiro (SILVA *et al.* 2006b).

No presente estudo, utilizando-se BSA como substrato protéico solúvel, detectou-se a presença de peptidases associadas às células de micélio e conídios de *P. boydii*. Os resultados demonstram uma produção de peptidases significativamente maior associada às células de micélio do que associadas às células de conídios de *P. boydii*. A atividade proteolítica mensurada em ambos os extratos celulares foram inibidas em mais de 95% pela 1,10-fenantrolina, sugerindo a presença majoritária de metalopeptidases. Através de SDS-PAGE contendo BSA como substrato, observou-se a produção de diferentes metalopeptidases no conídio (uma única atividade de 28 kDa) e em micélio (aproximadamente 6 atividades com massas moleculares variando de 28 a 90 kDa). Estes resultados sugerem uma expressão diferencial, tanto quantitativa quanto qualitativa, de metalopeptidases nas duas principais formas celulares observadas em *P. boydii*. O inibidor proteolítico 1,10-fenantrolina também foi capaz de inibir completamente a degradação de BSA solúvel pelas peptidases secretadas por *P. boydii*, demonstrando também a presença de metalopeptidases no PBS condicionado. O EDTA, um agente quelante e também conhecido inibidor de metalopeptidases, também foi capaz de inibir a atividade proteolítica secretada, porém numa concentração 10 vezes maior que 1,10-fenantrolina. O

EGTA não teve ação na atividade proteolítica secretada de *P. boydii*. Com esses resultados, podemos concluir que, dentre os inibidores de utilizados, 1,10-fenantrolina foi o composto mais eficaz em inibir as metalopeptidases produzidas por *P. boydii*, sugerindo a presença de metalopeptidases dependentes de íons Zn^{2+} .

Sabe-se que 1,10-fenantrolina é capaz de induzir uma série de distúrbios em uma variedade de sistemas biológicos (BUTLER *et al.*, 1969; GERAGHTY *et al.*, 2000). Como exemplo, formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, tratadas com 1,10-fenantrolina demonstraram drástica redução na proliferação celular e alterações morfológicas, dentre as quais: surgimento de depósitos elétron-densos (constituídos principalmente por íons cálcio) no citoplasma do parasito, assim como perturbação na membrana mitocondrial e nas cisternas do retículo endoplasmático (LANE *et al.*, 1998). Recentemente, foi reportado o efeito de agentes quelantes (1,10-fenantrolina, EDTA e EGTA) sobre a bactéria *Streptococcus agalactiae* (SANTOS *et al.*, 2009). Neste trabalho foi demonstrado que 1,10-fenantrolina foi capaz de inibir o crescimento da bactéria de forma dose dependente. EGTA e EDTA não tiveram efeito no crescimento bacteriano, porém esses compostos inibiram o processo de adesão e invasão das bactérias às células A549. Além disso, foi descrito o efeito do EDTA em inibir de maneira significativa a expressão de proteínas de superfície nestas bactérias, fato este que poderia estar diretamente associado com os mecanismos de inibição da aderência e invasão bacteriana (SANTOS *et al.*, 2009).

Tendo em vista o potencial antimicrobiano de 1,10-fenantrolina, alguns grupos de estudo têm despendido esforços na tentativa de, a partir desta molécula, criar compostos mais eficazes e menos tóxicos. MCCANN e colaboradores (2004) descreveram o potencial antifúngico do derivado fendio, formado pela inserção de duas moléculas de oxigênio na estrutura química de 1,10-fenantrolina. Neste trabalho foi ainda reportado a síntese de novos compostos formados a partir da complexação do fendio com metais de transição, como cobre e prata. Esses pesquisadores demonstraram ainda que a concentração mínima inibitória (MIC) utilizada do derivado fendio para inibir o crescimento de *C. albicans* foi de 0,6 $\mu\text{g/ml}$, concentração esta que foi quase 5 vezes menor do que o MIC para 1,10-fenantrolina (2,5 $\mu\text{g/ml}$). O derivado Cu^{2+} -fendio se mostrou menos eficaz que o fendio livre de metal, mas o mesmo foi mais eficaz que 1,10-fenantrolina, apresentando um MIC de 1,3 $\mu\text{g/ml}$. No mesmo estudo, foi demonstrado que o derivado Ag^{2+} -fendio foi o composto mais eficaz, apresentando um MIC de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ (MCCANN *et al.*, 2004). Essas observações nos levaram a avaliar os efeitos destes compostos sobre vários aspectos da biologia celular de *P. boydii*.

Nossos resultados demonstraram que 1,10-fenantrolina e todos os derivados foram capazes de inibir de modo significativo a atividade proteolítica secretada pelas hifas de *P. boydi*. Esses resultados

demonstraram pela primeira vez o efeito direto dos derivados de 1,10-fenantrolina sobre a inibição da atividade de enzimas proteolíticas. Estes compostos afetaram também a viabilidade celular de formas conidias de *P. boydii* de forma dose dependente. Em microrganismos, a transição de um estágio evolutivo para outro inclui modificações em quatro níveis: morfológico, fisiológico, antigênico e de infectividade (CHANG & FONG, 1982, SUDBERY, GOW & BERMAN, 2004). Uma característica fundamental da diferenciação celular é o desenvolvimento de estruturas especializadas que frequentemente desempenham funções específicas e indispensáveis para a patogênese. Sabendo das diferenças morfofisiológicas existentes entre os conídios e as hifas de um fungo filamentosos, avaliamos se as hifas também seriam susceptíveis a ação de 1,10-fenantrolina e seus derivados. Como resultado, observamos que o micélio do fungo foi mais susceptível a ação dos inibidores de metalopeptidases do que os conídios. Nesse sentido, 1,10-fenantrolina na concentração de 0,1 µg/ml não diminuiu a viabilidade dos conídios de forma significativa; no entanto, reduziu completamente a viabilidade celular das hifas. De forma similar ao observado com os resultados de conídios, observamos que fendio e Ag²⁺-fendio foram mais efetivos em inibir o crescimento das hifas de *P. boydii*. Estes dados corroboraram os dados supracitados obtidos por MCCANN e colaboradores (2004), no qual fendio e Ag²⁺-fendio foram mais efetivos em inibir o crescimento de *C. albicans*.

A capacidade de transição morfológica envolvendo a mudança de levedura para tubo germinativo/hifa é considerada um fator de virulência em *C. albicans* (HAYNES, 2001). As hifas de *C. albicans* são as formas mais invasivas e são frequentemente encontradas nos tecidos infectados (HAYNES, 2001). PINTO e colaboradores (2004) descreveram a formação de tubo germinativo a partir de conídios de *P. boydii*, quando do contato com células epiteliais da linhagem HEp2. No entanto, a formação do tubo germinativo ocorria após 2 h de contato fungo-célula, sugerindo uma modulação positiva da diferenciação estimulada pelo contato com o hospedeiro. Tendo em vista a importância deste fenômeno para a patogenicidade fúngica, avaliamos a influência de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre o processo de diferenciação celular em *P. boydii*. Todos os compostos foram capazes de inibir a diferenciação celular na concentração de 1 µg/ml. Na concentração de 0,1 µg/ml apenas fendio e Ag²⁺-fendio bloquearam totalmente este processo, enquanto que 1,10-fenantrolina e Cu²⁺-fendio bloquearam apenas parcialmente a transição morfológica. Vale ressaltar que a densidade celular utilizada nos experimentos de diferenciação celular foi de 1×10⁶ conídios e, neste caso, a viabilidade fúngica não foi afetada após o tratamento com os inibidores de metalopeptidases. O que nos leva a concluir que nessa densidade celular utilizada os inibidores apresentam um efeito fungistático. Sabemos que a interpretação do MIC de um antimicrobiano está diretamente relacionada com o inóculo do microrganismo. Em analogia a testes de susceptibilidade realizados em bactérias, aumentando-se o

número de células bacterianas, aumenta-se conseqüentemente o número de alvos, o que poderia exceder a sua capacidade de ação (GEHRT *et al.*, 1995).

É necessário levar em consideração que, sendo agentes quelantes, esses compostos derivados de 1,10-fenantrolina poderiam inibir de maneira inespecífica outras enzimas dependentes de cátions divalentes. GIL e colaboradores (1994) observaram que agentes quelantes, como o EDTA, bloquearam o desenvolvimento de hifas em *C. albicans*. Além disso, foi descrito por BANIN, BRADY & GREENBERG (2006) a capacidade do EDTA em desestabilizar o biofilme formado por bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa*. O biofilme microbiano é definido como uma associação de células microbianas fixada a superfícies bióticas ou abióticas, inclusas em uma complexa matriz extracelular compostas de substâncias poliméricas. A capacidade dos microrganismos em formar esses agregados celulares colabora com o estabelecimento de uma infecção. Os patógenos presentes em biofilmes apresentam aumento da resistência a agentes antimicrobianos e às ações do sistema imune (MARTINEZ & CASADEVALL, 2006). Baseados nestes fatos, avaliamos a capacidade de *P. boydii* em formar biofilme em superfícies abióticas para, posteriormente, avaliar o efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre os agregados celulares formados. Inicialmente foi realizada uma cinética de formação de biofilme. Os resultados demonstraram uma maior formação de agregados celulares após 48 h de incubação, e o início de uma dissociação dos agregados após 72 h. Quando os conídios de *P. boydii* foram pré-tratados com os derivados de 1,10-fenantrolina foi observado um efeito inibitório de aproximadamente 50% na formação do biofilme. No pré-tratamento, 1,10-fenantrolina não promoveu nenhum efeito inibitório sobre a formação do biofilme de *P. boydii*. Através de microscopia eletrônica de varredura, foram avaliadas a estruturação e a composição celular do biofilme de *P. boydii*. Os resultados mostraram que nos sistemas pré-tratados com fendio, Cu^{2+} -fendio e Ag^{2+} -fendio existiam menos conídios aderidos e não havia a presença de hifas. Estes resultados sugerem que os compostos poderiam alterar moléculas de superfície referentes à adesão dos conídios à superfície inerte, visto que dados já supracitados nos revelaram que a viabilidade fúngica não era alterada nestas condições.

Nos sistemas onde os inibidores foram incubados juntamente com os conídios observamos um efeito inibitório menos drástico, porém o fendio, Cu^{2+} -fendio e Ag^{2+} -fendio ainda foram capazes de inibir de modo significativo (~35%) a formação de biofilme. Como já foi dito anteriormente, a formação de biofilme é uma forma de resistência dos microrganismos à ação de compostos antimicrobianos, este fato parece se repetir com o biofilme de *P. boydii*, uma vez que foi observado um efeito menos drástico quando da adição de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre o biofilme maduro. Somente 1,10-fenantrolina e fendio foram capazes de desorganizar de modo significativo (~ 30%) o biofilme já formado.

A capacidade de aderir aos tecidos do hospedeiro permite a colonização daquele ambiente pelos microrganismos e facilita o processo de invasão. Os mecanismos de adesão celular são complexos e multifatoriais. Moléculas de superfície bem como as cargas eletrostáticas medeiam ativamente os processos adesivos (ALVIANO, TRAVASSOS & SCHAUER, 1999; KARKOWSKA-KULETA, RAPALA-KOZIK & KOZIK, 2009). Peptidases presentes na superfície de microrganismos podem atuar como adesinas num mecanismo independente de ação enzimática (KARKOWSKA-KULETA, RAPALA-KOZIK & KOZIK, 2009). Estudos em *C. albicans* demonstraram que cepas produtoras de aspártico peptidases são capazes de aderir significativamente mais a células do epitélio bucal do que cepas não produtoras desta classe de peptidases (NAGLIK, CHALLACOMBE & HUBE, 2003). Mais recentemente, PALMEIRA e colaboradores (2008) descreveram o efeito de inibidores proteolíticos, utilizados na quimioterapia anti-HIV, em modular negativamente a adesão e a internalização do fungo *Fonsecaea pedrosoi* a macrófagos, fibroblastos e células epiteliais da linhagem CHO.

No nosso modelo de estudo, os resultados demonstraram que o tratamento dos conídios com 1,10-fenantrolina e seus derivados foram capazes de modular o processo de interação de *P. boydii* com diferentes linhagens de células de mamíferos. O mecanismo pelo qual as peptidases interferem no processo de adesão continua obscuro, porém existem duas hipóteses aventadas: (i) as peptidases poderiam funcionar como adesinas e/ou (ii) as peptidases secretadas e/ou presentes na superfície de microrganismos seriam capazes de alterar conformacionalmente moléculas de superfície presentes na célula hospedeira e essa mudança seria importante para a aderência do microrganismo (NAGLIK, CHALLACOMBE & HUBE, 2003). Em *P. boydii*, ainda são necessários novos estudos para responder a esta questão; porém, acreditamos que o tratamento com os inibidores de metalopeptidases poderia alterar a expressão de moléculas de superfície importantes para a aderência fúngica. Tendo este fato em mente, avaliamos o efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados na expressão de moléculas de superfície em *P. boydii*, utilizando vários marcadores.

Sabe-se que a superfície fúngica é rica em glicoconjugados, em especial os que contêm em sua composição unidades de manose, que são moléculas importantes para a interação com o hospedeiro (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006). Assim, avaliamos a modulação da expressão de glicoconjugados ricos em manose/glucose, através do uso da lectina Con A, em conídios tratados com 1,10-fenantrolina e seus derivados. Os resultados mostraram que somente o derivado Cu²⁺-fendio foi capaz de modular negativamente a expressão destes glicoconjugados na superfície de *P. boydii*. Uma das moléculas de superfície de *P. boydii* já bem caracterizada trata-se de um peptideopolissacarídeo rico em manose, denominado de PRM (PINTO *et al.*, 2001). A PRM está diretamente envolvida no processo de interação de conídios com células do hospedeiro (PINTO *et al.*, 2004). Tendo em vista o resultado anterior, onde o

derivado Cu²⁺-fendio foi capaz de diminuir a expressão de glicoconjugados ricos em manose na superfície de *P. boydii* e sabendo da importância da PRM nos processos de adesão fúngica, avaliamos o efeito dos inibidores de metalopeptidases na expressão de PRM. Corroborando o resultado anterior, o derivado Cu²⁺-fendio foi capaz de inibir em aproximadamente 50% a expressão de PRM na superfície dos conídios de *P. boydii*. Observamos também que fendio e Ag²⁺-fendio foram capazes de reduzir em menores proporções à exposição de PRM na superfície fúngica, enquanto 1,10-fenantrolina não alterou a expressão desta molécula. Estes resultados sugerem que uma diminuição na expressão desta adesina possa justificar, pelo menos em parte, a redução nos índices de associação de conídio de *P. boydii* quando tratados com os derivados de 1,10-fenantrolina.

A fibronectina é uma glicoproteína que circula no plasma em grandes quantidades como um dímero, sendo também encontrada na matriz extracelular e revestindo células epiteliais. A fibronectina solúvel também é encontrada nos fluidos corporais e nas secreções, como nas secreções inflamatórias (DUBREUIL *et al.*, 2002). Vários estudos relatam a importância da ligação a proteínas de matriz extracelular na patogênese microbiana. PENN & KLOTZ (1994) descreveram que leveduras de *C. albicans* se ligam à fibronectina solúvel através de um receptor glicoprotéico de superfície. Esse mesmo grupo também propôs que essa interação entre a fibronectina solúvel e *C. albicans* poderia ser, *in vivo*, um evento importante no processo de disseminação, onde o microrganismo ganharia acesso ao espaço intersticial. Após a etapa de ligação à fibronectina, *C. albicans* seria capaz de secretar enzimas proteolíticas, em especial a aspártico peptidase 2 (Sap2), capazes de degradar este constituinte protéico (HUBE, 2000). Em um estudo desenvolvido por nosso grupo foi descrito que as metalopeptidases secretadas por *P. boydii* foram capazes de hidrolisar fibronectina humana (SILVA *et al.*, 2006b). No entanto, nada se sabia sobre a capacidade desse fungo em se ligar a essa proteína de matriz extracelular. Nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, que conídios de *P. boydii* foram capazes de se ligar à fibronectina humana de forma dose dependente. Tendo em vista este fato e sabendo da importância desta ligação para os mecanismos de interação celular, avaliamos a modulação da expressão de proteínas ligadoras de fibronectina após a incubação de conídios com 1,10-fenantrolina e seus derivados. Os resultados demonstraram que todos os compostos foram capazes de reduzir a expressão de moléculas capazes de se ligar à fibronectina localizadas na superfície de *P. boydii*.

Coletivamente, podemos sugerir que as alterações na expressão de moléculas localizadas na superfície fúngica, induzidas pelo tratamento com os inibidores de metalopeptidases, podem ser responsáveis pela diminuição dos índices de associação com as células de mamífero e até mesmo pela diminuição da adesão à superfície abiótica. Análises por microscopia eletrônica de varredura evidenciaram que 1,10-fenantrolina não alterou a ultraestrutura celular, ao passo que os demais

inibidores causaram alterações drásticas na rugosidade de superfície e na morfologia do fungo. Estes dados parecem estar de acordo com nossas observações indicando que fendio, Cu^{2+} -fendio e Ag^{2+} -fendio se mostraram mais eficazes em diminuir a formação de biofilme, diminuir os índices de associação e diminuir a expressão de moléculas importantes na superfície de *P. boydii*.

É esperado, e desejável, que um agente antimicrobiano seja capaz de atingir o microrganismo nos sítios celulares infectados durante o processo patogênico. Nesse sentido, avaliamos a capacidade de 1,10-fenantrolina e seus derivados em diminuir a carga fúngica após a interação de conídios com macrófagos. Nossos resultados demonstraram que todos os inibidores foram capazes de diminuir, de maneira significativa, a viabilidade celular do fungo após interação com fagócitos, sendo fendio e Ag^{2+} -fendio os mais eficazes nesse sentido. Vale ressaltar que na faixa de concentração dos inibidores utilizada nesse experimento, os macrófagos não tiveram sua viabilidade alterada. Não podemos afirmar, no entanto, qual mecanismo foi responsável pela diminuição da sobrevivência intracelular. Hipóteses podem ser aventadas: os compostos atingiram os conídios intracelulares, diminuindo assim sua viabilidade; os macrófagos foram sensibilizados com os compostos, aumentando seu poder de “killing”; ou ambas as hipóteses podem ser verdadeiras e terem acontecido de forma sinérgica.

Estudos na literatura vêm demonstrando que alguns compostos têm a capacidade de alterar a expressão de esteróis em microrganismos (ESHWIKA *et al.*, 2004). Tendo em vista este fato, analisamos o efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados na expressão de esteróis de membrana em *P. boydii*. Como resultado, foi visto que todos os compostos utilizados foram capazes de aumentar a expressão de moléculas de esteróis em *P. boydii*. O derivado fendio foi capaz de aumentar em duas vezes a quantidade dessas moléculas quando comparado ao sistema não tratado com os inibidores; porém, o composto que se mostrou mais eficaz em modular essa expressão foi o Ag^{2+} -fendio, que aumentou a expressão dos esteróis em aproximadamente seis vezes. Resultados similares foram obtidos por ESHWIKI e colaboradores (2004) quando do tratamento do fungo *C. albicans* com o composto Ag^{2+} -fendio.

Conforme citado anteriormente, *P. boydii* é extremamente resistente à anfotericina B e ao fluconazol (CORTEZ *et al.*, 2008), que são drogas que têm como alvos as moléculas de ergosterol presentes na membrana celular fúngica e a via biossintética do ergosterol, respectivamente (GILGADO *et al.*, 2006). Nesse sentido, avaliamos se 1,10-fenantrolina e seus derivados utilizados em concentrações subinibitórias apresentariam sinergismo com anfotericina B e com fluconazol, quando também utilizados em concentrações subinibitórias. A associação de 1,10-fenantrolina e seus derivados à anfotericina B diminuiu a viabilidade celular fúngica em todos os sistemas, principalmente quando foram usados fendio e Ag^{2+} -fendio. Quando os sistemas foram tratados com os inibidores e com

fluconazol só observamos diminuição na viabilidade celular nos sistemas com Ag^{2+} -fendio e Cu^{2+} -fendio; porém, essa diminuição foi menor quando comparada ao tratamento com a anfotericina B. Em células de mamíferos a síntese de esteróis é controlada pelas proteínas ligadoras de elementos reguladores de esterol (SREBPs), as quais são encontradas na membrana do retículo endoplasmático. Quando existe baixa de oxigênio na célula o domínio ativo destas proteínas se deslocam para o núcleo e se ligam a domínios regulatórios, que resultam na transcrição de múltiplos genes envolvidos na síntese de colesterol (HORTON & SHIMOMURA, 1999; HORTON, 2002). Estudos recentes identificaram dois genes homólogos às SREBP de mamíferos no fungo *Schizosaccharomyces pombe* (*Sre1⁺* e *Sre2⁺*). Esses genes codificam a produção da proteína *Sre1p*, que são ativadas em condições de hipoxia codificando para um aumento na biossíntese de ergosterol, de forma similar ao que acontece nas células de mamíferos (TODD *et al.*, 2006). Outro estudo demonstrou a presença de uma sequência gênica homóloga ao gene *Sre1⁺* de *S. pombe* em *C. albicans* (ROWAN *et al.*, 2009). Neste estudo ainda foi reportado que o composto [Ag(1-(3-aminopropil)imidazol)]ClO₄ foi capaz de matar as leveduras, inibindo o processo de respiração celular, através da diminuição da concentração intracelular de oxigênio. Nesse trabalho foi demonstrado também que o tratamento com o composto [Ag(1-(3-aminopropil)imidazol)]ClO₄ induziu à um aumento na expressão do gene *Sre1⁺* de *C. albicans* e com isso um aumento na expressão de ergosterol pelas células da levedura (ROWAN *et al.*, 2009). Esses dados juntamente com nossos resultados nos levaram a formular duas hipóteses: (i) o tratamento com os inibidores de metalopeptidases altera a biossíntese de ergosterol, aumentando a expressão de seus precursores, diminuindo o conteúdo de ergosterol na membrana plasmática e com isso aumentando a permeabilidade às drogas antifúngicas e aos próprios inibidores; (ii) os inibidores estariam diminuindo a concentração de oxigênio na célula fúngica, interferindo na biossíntese do ergosterol, fazendo com que esta molécula se torne mais abundante na membrana citoplasmática do fungo e com isso os alvos para a ligação da anfotericina B na célula fúngica estariam em maior número, tornando o fungo mais susceptível a esta droga.

A toxicidade dos compostos derivados de 1,10-fenantrolina em células hospedeiras foi avaliada em diferentes linhagens celulares. De uma forma geral, as linhagens celulares se mostraram pouco menos sensíveis à ação dos inibidores de metalopeptidases. A 1,10-fenantrolina foi o menos tóxico dos inibidores, seguida do composto Ag^{2+} -fendio. Estes dados nos motivaram a iniciar estudos *in vivo* utilizando camundongos suíços albinos. Os testes de toxicidade aguda mostraram que 1,10-fenantrolina e Ag^{2+} -fendio foram os inibidores menos tóxicos. Na concentração de 45 mg/Kg de peso dos camundongos não foram observados óbitos; sendo assim, escolhemos esta concentração para estudos de toxicidade crônica. Neste estudo os camundongos foram injetados diariamente, durante cinco dias

consecutivos, com 1,10-fenantrolina e seus derivados e os animais acompanhados por sete dias. Os resultados demonstraram que os animais permaneceram vivos após este esquema de tratamento e que a atividade de duas enzimas hepáticas (TGO e TGP) não foi alterada após sete dias de pós-tratamento. Em conjunto, estes dados sugerem uma possível aplicação destes compostos em experimentos de infecção *in vivo*.

Sabe-se que *P. boydii* é capaz de aderir e invadir células epiteliais e que este mecanismo pode ser essencial no curso da infecção por este fungo (PINTO *et al.*, 2004). Todavia, a complexidade das interações que ocorrem entre fungos patogênicos e seus hospedeiros nos sugerem que estes microrganismos apresentam um grande número de mecanismos de aderência (KARKOWSKA-KULETA, RAPALA-KOZIK & KOZIK, 2009). Por isso mais estudos são necessários pra que conheçamos as prováveis adesinas presentes na parede celular de *P. boydii* bem como os receptores presentes nas células hospedeiras. Neste contexto, sabemos que os componentes da matriz extracelular podem participar de eventos como adesão e invasão de microrganismos a tecidos do hospedeiro (GAUR *et al.*, 1999; WASYLKA *et al.*, 2000; MENDES-GIANNINI *et al.*, 2006). Como demonstrado anteriormente, por nossos resultados, conídios de *P. boydii* demonstraram a capacidade de se ligar à fibronectina humana. Dessa forma, passamos a investigar a ocorrência de moléculas mediadoras desta interação usando diferentes abordagens. Ensaio de ELISA demonstraram a capacidade de conídios de *P. boydii* de se ligarem à fibronectina imobilizada, essa ligação se mostrou dose-dependente e específica. A presença de moléculas ligadoras à fibronectina foi confirmada através de ensaios de imunofluorescência. Em nosso sistema, essas moléculas parecem estar uniformemente distribuídas na superfície de conídios e micélio, este fato nos leva a crer que a expressão destas moléculas não é reprimida com a diferenciação celular. Dados diferentes foram obtidos em estudos realizados com *P. marneffeii* (HAMILTON *et al.*, 1999), onde foi reportada a presença de moléculas ligadoras à fibronectina apenas nos conídios e não nas hifas do fungo. Porém, dados similares aos nossos foram obtidos por LIMA e colaboradores (2004) que reportaram a presença de moléculas ligadoras à fibronectina e à laminina em conídios, hifas e leveduras de *S. schenckii*. Avaliamos, em seguida, o perfil polipeptídico correspondente às moléculas ligadoras de fibronectina no extrato celular de conídios e micélio de *P. boydii*. Os resultados demonstraram um perfil de marcação muito similar nos extratos de ambas as formas, sendo detectadas seis bandas protéicas com massas moleculares aparentes variando de 55 a 11 kDa, que tiveram a capacidade de se ligar à fibronectina solúvel. Estes dados corroboram a ausência de modulação na expressão de proteínas ligadoras à fibronectina em conídios e hifas de *P. boydii*.

A presença de fibronectina é capaz de estimular a invasão das células A549 por bactérias da espécie *Streptococcus pyogenes* (CUE *et al.*, 1998). Mais recentemente GONZÁLES e colaboradores (2008a)

descreveram a presença de fibronectina na superfície das células A549 e demonstraram que essa molécula, bem como o fibrinogênio, são proteínas importantes para a interação de conídios de *P. brasiliensis* com células A549. Nossos resultados demonstraram que a ligação à fibronectina é um evento importante na interação de *P. boydii* com células hospedeiras. Esse fato nos leva a supor que, assim como ocorre pra outros patógenos, a capacidade de adesão à fibronectina pode ser um passo essencial para a patogênese de *P. boydii*, porém estudos mais aprofundados, como a purificação da(s) provável(is) adesina(s) e a identificação dos receptores presentes nas células hospedeiras faz-se necessários para confirmação desta suposição.

Além das proteínas de superfície, sabe-se que as proteínas secretadas para o meio extracelular podem participar ativamente de processos como reconhecimento, sinalização celular e interação com o hospedeiro, sendo importantes na patogênese de muitos microrganismos (CASADEVALL & PIROFSKI, 2003). Tendo em vista este fato, o estudo mais detalhado de moléculas secretadas por um patógeno é de extrema relevância. No ano de 2006, nosso grupo descreveu o perfil polipeptídico de moléculas secretadas por *P. boydii*, incluindo a presença de duas metalopeptidases (SILVA *et al.*, 2006b). No estudo aqui apresentado, visamos aprofundar esses dados, com o intuito de conhecer mais amplamente o perfil de moléculas protéicas secretadas por *P. boydii*.

O entendimento da expressão, função e regulação do grupo total de proteínas num sistema celular é um grande desafio. No caso de patógenos, o conhecimento do conjunto de proteínas expressas numa determinada situação poderia fornecer importantes informações sobre mecanismos de colonização, interações com o hospedeiro, patogênese e também novos alvos para agentes antifúngicos. Para tanto se faz necessário o uso conjunto de estratégias pós-genômicas, incluindo a proteômica (BHADAURIA *et al.*, 2007; CARBERRY & DOYLE, 2007). O estudo da proteômica, que é definida como a análise do conjunto de proteínas expressas por um genoma, célula ou tecido, em condições específicas, permite identificar e quantificar um grande número de proteínas envolvidas no metabolismo celular, além de permitir análises diferenciais durante o crescimento, desenvolvimento, diferenciação celular, e adaptação celular a ambientes (WILKINS, 2002). A composição protéica total de um sistema celular é naturalmente complexa. Dessa forma, uma estratégia comumente encontrada para facilitar o entendimento sobre as funções de proteínas expressas em determinados sistemas é o estudo dos chamados sub-proteomas, que são frações do proteoma total de uma determinada espécie. Como exemplos de sub-proteomas podem ser citados sub-proteomas de organelas (mitocôndria, núcleo), glicoproteoma (proteínas glicosiladas), fosfoproteomas (proteínas fosforiladas) e secretoma (conjunto de proteínas secretadas por um organismo) (KIM, NANDAKUMAR & MARTEN, 2007). Um exemplo de caracterização de sub-proteoma foi descrito em *A. fumigatus* (ASIF *et al.*, 2006). A análise proteômica de

extratos de parede do fungo revelou 26 proteínas diferentes, incluindo proteínas do tipo “rodlet” A, peptidases ácidas do tipo PEP2, uma lipase, uma disulfito isomerase e uma frutose-1,6-bisfosfatase. A AspF3, um conhecido alérgeno presente em *A. fumigatus*, foi também identificada (ASIF *et al.*, 2006). Dentro dessa linha de estudos, procuramos nos aprofundar na análise das proteínas secretadas por *P. boydii*.

Nossa primeira meta foi avaliar a reatividade sorológica das moléculas secretadas por *P. boydii*. Em *P. boydii* já foram descritas duas moléculas de superfície com propriedades antigênicas, PRM e CMH. Em nosso modelo, observamos a existência de proteínas secretadas antigênicas com massas moleculares de 20 a 110 kDa. Esses resultados nos sugerem que *P. boydii* secreta antígenos protéicos, os quais foram reconhecidos por soro de paciente com pseudallescheriose. Esses dados podem fornecer subsídios para a detecção de potenciais moléculas com aplicação no diagnóstico da pseudallescheriose.

Como descrito anteriormente, proteínas secretadas desempenham funções vitais para a fisiologia e patogenicidade de fungos. Sendo assim, a análise de secretômica de fungos filamentosos mostra-se promissora para a identificação do arsenal de proteínas de toda natureza secretada pelos fungos. Em *A. oryzae*, ODA e colaboradores (2006) mostraram por uma abordagem proteômica que a produção de proteínas secretadas varia de acordo com o meio de cultivo. Proteínas como glucoamilase A e xilanase G2 foram detectadas apenas em meio líquido, enquanto glucoamilase B e a dipeptidil peptidase foram detectadas apenas em meio sólido. Outros estudos em secretômica de fungos vêm sendo realizados, incluindo *A. flavus* (MEDINA *et al.* 2004), *Trichoderma reesei* (VINZANT *et al.* 2001), *T. harzianum* (SUÁREZ *et al.* 2005) e *Fusarium graminearum* (PAPER *et al.* 2007). Entretanto, todos estes estudos foram desenvolvidos na tentativa de um aprimoramento da produção de enzimas de interesse industrial. Para patógenos, as análises de secretoma são ainda limitadas. Acredita-se que a identificação de proteínas extracelulares permitirá o desenvolvimento de análises preditivas que poderão facilitar a identificação de candidatos a alvos para novos antifúngicos e também vacinas contra patógenos fúngicos (ASIF *et al.*, 2006; CARBERRY & DOYLE, 2007).

A identificação das proteínas secretadas de *P. boydii* foi limitada pela indisponibilidade de sequências genômicas de *P. boydii*. Outras limitações na identificação proteômica incluem resistência à hidrólise por tripsina devido à glicosilação (DESHPANDE *et al.*, 2008). Considerando essas dificuldades, alcançamos o número de 22 proteínas com identificação sugerida.

Estudos vêm demonstrando que proteínas fúngicas apresentam mais do que uma simples função e, além disso, são encontradas em diferentes localizações na célula fúngica (RODRIGUES *et al.*, 2008). Como exemplo, podemos citar estudos realizados com o fungo *P. brasiliensis* (FONSECA *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2006; BATISTA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007). Análises proteômicas revelaram a

presença, dentre outras moléculas, das enzimas, conhecidas por participarem da via glicolítica, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e triosefosfato isomerase (TPI) associadas à superfície celular de *P. brasiliensis*, bem como a TPI foi detectada também no sobrenadante de cultivo do fungo. Estudos de caracterização adicionais revelaram que ambas as enzimas possuíam capacidade de ligação a componentes de matriz extracelular (laminina, fibronectina e colágeno) bem como, por meio de ensaios de interação com células A549, foi possível verificar que estas moléculas tinham um provável papel como mediadoras da adesão às células hospedeiras. Deste modo, pode-se supor um importante papel da GAPDH e da TPI no estabelecimento da infecção, contribuindo para interação do fungo com células hospedeiras e para a disseminação fúngica (FONSECA *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007).

Como exemplo adicional, podemos citar estudos realizados no fungo fito-patógeno *Ceratocystis fimbriata* (BODDI *et al.*, 2004). Estudos demonstraram a presença da proteína cerato-platanina (CP) na parede celular de conídios, micélio e ascósporos do fungo, sugerindo uma função estrutural pra está proteína. Porém está mesma proteína secretada foi capaz de elicitar a síntese de fitoalexinas em folhas de *Platanus acerifolia* (plátano híbrido) e causar morte celular, sugerindo, desta forma, uma função na patogênese deste fungo (BODDI *et al.*, 2004).

No secretoma de *P. boydii* foi identificada uma vasta diversidade protéica. Dentre as proteínas identificadas encontramos proteínas de via glicolítica (triosefosfato isomerase, malato desidrogenase, frutose-1,6-bisfosfato aldolase, fosfoglicerato mutase e fosfohexomutase), proteínas associadas ao citoesqueleto (dineína e cofilina), proteína associada à membrana plasmática (permease), proteínas envolvidas em mecanismos de sinalização celular (proteína 1 ativada por GTPase/ran, nucleosídeo difosfato quinase e proteína quinase), proteína associada a proteção contra o estresse oxidativo (proteína hipotética MGG_02710, relacionada à família das peroxiredoxinas) e outras proteínas importantes para o metabolismo fúngico (aspártico peptidase, fosfatase, proteína ligadora de nucleotídeo, esteróide 5- α -redutase, aspartato semi-aldeído desidrogenase, fosfomanomutase, manitol-1-fosfato-desidrogenase, proteína hipotética MGG_05974, relacionada ao desenvolvimento do micélio). Vale ressaltar aqui a presença de proteínas já associadas à virulência em fungos como, as peroxiredoxinas e as aspártico peptidases secretadas (SANGLARD *et al.*, 1997; HUBE, 2000; CAMPOS *et al.*; 2005).

Semelhantemente uma complexa composição protéica foi identificada em estudos proteômicos de vesículas secretadas por *C. neoformans* (RODRIGUES *et al.*, 2008). Nesse estudo, foram identificadas 76 proteínas, incluindo várias associadas a mecanismos de virulência, como superóxido dismutase, fosfatase ácida, lacase e proteínas de choque térmico. Em estudo similar, utilizando como modelo o *H.*

capsulatum, mais de 200 proteínas foram caracterizadas como componentes de vesículas extracelulares (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008). Os dois trabalhos supracitados revelaram uma complexa composição protéica tanto nas vesículas secretadas pelo *C. neoformans* quanto nas vesículas secretadas pelo *H. capsulatum* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008). Nestas preparações foram identificadas proteínas associadas ao metabolismo de aminoácidos, açúcares e lipídeos, proteínas ribossomais, componentes de proteossomas, proteínas nucleares, proteínas da parede celular, chaperonas, proteínas com propriedades anti-oxidantes, proteínas do citoesqueleto, proteínas relacionadas ao crescimento e divisão celular, proteínas de membrana plasmática, dentre outras (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008).

Como podemos observar os fungos têm a capacidade de secretar muitas proteínas caracterizadas antes como proteínas exclusivamente citoplasmáticas, esta alta diversidade de proteínas extracelulares pode conferir aos fungos uma alta capacidade de adaptação fisiológica e de patogenicidade. No trabalho de RODRIGUES e colaboradores (2008) foi levantada a hipótese dos fungos produzirem exossomas, que são vesículas extracelulares que carregam componentes citoplasmáticos. Em células de mamíferos, os exossomos já foram descritos como participantes da eliminação de proteínas não funcionais e também como carreadores de proteínas importantes em mecanismos de sinalização entre células (VAN NIEL *et al.*, 2006). Em fungos patogênicos, poder-se-ia especular que os exossomos seriam mais um mecanismo de liberação de moléculas relacionadas à patogenicidade (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008). Apesar do nosso trabalho não ser focado na secreção de vesículas, poderíamos supor um mecanismo de secreção semelhante entre *P. boydii*, *C. neoformans* e *H. capsulatum*, sugerindo assim um mecanismo de secreção conservado em fungos.

Como dito anteriormente o genoma de *P. boydii* ainda não foi sequenciado, por este fato foi necessário validar experimentalmente as sequências obtidas na análise proteômica. Dessa forma, algumas das atividades enzimáticas identificadas no secretoma de *P. boydii* foram avaliadas por métodos bioquímicos. Em função de aspectos relacionados à maior viabilidade experimental, foram selecionadas as enzimas adenilato quinase, manitol 1,5-fosfato desidrogenase, triosefosfato isomerase, malato desidrogenase, aldolase e aspártico peptidase. Os resultados comprovaram a presença de todas as enzimas testadas no sobrenadante de *P. boydii*, estes dados corroboram às análises proteômicas, validando a autenticidade do método utilizado neste estudo.

A relevância do presente estudo mostra-se diretamente associada com o crescente número de casos de pacientes imunocomprometidos e com a falha no tratamento destes pacientes. Este quadro claramente facilita a infecção do hospedeiro por espécies previamente tidas como não patogênicas, o que demonstra a importância da procura de novos alvos terapêuticos bem como de novos compostos

com ação antifúngica. O número de relatos de infecção oportunista por *P. boydii* tem aumentado consideravelmente, o que é associado ao difícil tratamento, principalmente explicado pela resistência do fungo a antifúngicos clássicos, como a anfotericina B. Dessa forma, estudos que visem à descoberta de compostos capazes de inibir processos vitais associados à biologia celular bem como à interação de *P. boydii* com células hospedeiras, podem revelar compostos promissores a serem utilizados numa futura quimioterapia para o tratamento da pseudallescheriose.

Conclusões

6) CONCLUSÕES

- I. Identificamos uma atividade proteolítica associada aos conídios de *P. boydii* (28 kDa) e pelo menos seis atividades proteolíticas (28 e 90 kDa) associadas ao micélio de *P. boydii*. Todas as atividades proteolíticas associadas às células foram completamente inibidas na presença de 1,10-fenantrolina, sugerindo a atividade de metalopeptidases, provavelmente zinco-dependentes.
- II. Através de dosagem química da atividade proteolítica, utilizando-se BSA como substrato solúvel, observamos que 1,10-fenantrolina e seus derivados foram capazes de inibir em aproximadamente 80% a atividade proteolítica secretada por *P. boydii*.
- III. A 1,10-fenantrolina e seus derivados foram capazes de inibir a viabilidade celular de conídios e micélio de *P. boydii* de maneira dose dependente, assim como o processo de diferenciação celular neste fungo.
- IV. A 1,10-fenantrolina e seus derivados alteram moléculas de superfície importantes para processos de aderência de *P. boydii*, como glicoconjugados ricos em manose/glucose, proteínas ligadoras à fibronectina e PRM, resultando em uma redução nos índices de associação do fungo com células hospedeiras e uma menor adesão à superfície abiótica e formação de biofilme.
- V. Todos os inibidores proteolíticos utilizados foram capazes de aumentar a expressão de esteróis em *P. boydii* e o uso em associação destes inibidores com anfotericina B e com o fluconazol resultou em uma diminuição na viabilidade fúngica.
- VI. Os inibidores proteolíticos se mostraram menos tóxicos pra diferentes linhagens celulares e para camundongos suíços albinos do que para conídios de *P. boydii*.
- VII. Polipeptídeos capazes de se ligar à fibronectina foram detectadas tanto no extrato celular de conídios quanto no extrato celular de micélio de *P. boydii*, este dado foi corroborado através de imunofluorescência. Por imunocitoquímica ultraestrutural foi demonstrado que as

moléculas ligadoras à fibronectina se encontram tanto na parede celular do fungo quanto em vesículas localizadas no citoplasma.

- VIII. Proteínas secretadas com caráter antigênico foram detectadas no sobrenadante das formas micelianas de *P. boydii*. As proteínas foram reativas contra soro hiperimune de coelho e com soro de um paciente com pseudallescheriose.
- IX. Análises proteômicas nos levaram a identificação de 22 proteínas presentes no sobrenadante de *P. boydii*, dentre estas encontramos: proteínas de via glicolítica (triosefosfato isomerase, malato desidrogenase, frutose-1,6-bisfosfato, aldolase, fosfoglicerato mutase), proteínas associadas ao citoesqueleto (dineína e cofilina) e outras proteínas importantes para o metabolismo fúngico (aspártico peptidase, permease, fosfatase, esteróide 5- α -redutase, aspartato semi-aldeído desidrogenase, fosfomanumutase, proteína quinase, manitol-1-fosfato-desidrogenase).

Referências Bibliográficas

- ABAD-ZAPATERO, C., GOLDMAN, R., MUCHMORE, S., HUTCHINS, C., STEWART, K., NAVAZA, J., PAYNE, C.D. & RAY, T.L. (1996). Structure of a secreted aspartic proteases from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: implications for the design of a antifungal agents. *Protein Sci.*, 5: 640-652.
- ABBENANTE, G. & FAIRLIE, D.P. (2005). Protease inhibitors in the clinic. *Med. Chem.* 1: 71-104.
- ADRIO, J. L. & DEMAINE, A. L. (2003). Fungal biotechnology. *Int. Microbiol.* 6(3): 191-9.
- ALBRECHT, A.; FELK, A.; PICOVA, I.; NAGLIK, J.R.; SCHALLER, M.; DE GROOT, P.; MACCALLUM, D.; ODDS, F.C.; SCHÄFER, W.; KLIS, F.; MONOD, M. & HUBE B. (2006). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J. Biol. Chem.* 281: 688-94.
- ALBUQUERQUE, P.C.; NAKAYASU, E.S.; RODRIGUES, M.L.; FRASES, S.; CASADEVAL, A.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; ALMEIDA, I.C. & NOSANCHUK, J.D. (2008). Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for *trans*-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell. Microbiol.* 10: 1695-1710.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W. & BLACKWELL, M. (1996). In: *Introductory Mycology*, 4 ed. John Wiley & Sons EUA. Phylum Ascomycota – Filamentous Ascomycetes, pp. 294-322.
- ALVIANO, C. S., TRAVASSOS, L. R., SCHAUER R. 1999, Sialic acids in fungi: A minireview. *Glycoconj. J.* 16, 545-554.
- ANDREOTTI, P. F.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; BAILÃO, A. M.; SOARES, C. M.; BENARD, G.; SOARES, C. P. & MENDES-GIANNINI, M. J. (2005). Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes. Infect.* 7(5-6): 875-81.
- ASIF, A. R.; OELLERICH, M.; AMSTRONG, V. W.; RIEMENSCHNEIDER, B.; MONOD, M. & REICHARD, U. (2006). Proteome of conidial surface associated proteins of *Aspergillus fumigatus* reflecting potential vaccine candidates and allergens. *J Proteome Res.* 5(4): 954-62
- BAHIA M.C.F.S, HAIDO R.M.T., FIGUEIREDO M.H.G., LIMA DOS SANTOS, G.P.; LOPES BEZERRA, L.M.; HEARN, V.M. & BARRETO-BERGTER, E. (2003). Humoral immune response in aspergillosis: an immunodominant glycoprotein of 35 kDa from *Aspergillus flavus*. *Curr. Microbiol.* 47: 163-168.
- BANIN, E.; BRADY, K. M. & GREENBERG, E. P. (2006). Chelator-Induced Dispersal and Killing of *Pseudomonas aeruginosa* Cells in a Biofilm. *Appl. Environment. Microbiol.* 72(3): 2064-2069.
- BARBOSA, M.S., BÃO, S.N., ANDREOTTI, P.F., DE FARIA, F.P., FELIPE, M.S., DOS SANTOS FEITOSA, L., MENDES-GIANNINI, M.J., SOARES, C.M. (2006). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect. Immun.* 74: 382-389.
- BARRET, A. J. (1996). An introduction to the proteinases. In: *Proteinase Inhibitors*, Barret, A. J. & Alvensen, G. S. (ed.) Amsterdam Elsevier Science, pp. 3-22.
- BARRETT A. J.; TOLLE D. P. AND RAWLINGS N. D. (2003). Managing peptidases in the genomic era. *Biol. Chem.*, 384(6): 873-882.

- BARRETT, A.J. (1986). An introduction to the proteinases. In: Barret, A.J. & Salvesen. G., eds. Proteinase Inhibitors. Amsterdam Elsevier Science, pp. 3-22.
- BARRETT, A.J. (1994). Classification of peptidases. *Meth. Enzymol.* 244: 1-15.
- BARRETT, A.J., RAWLINGS, N.D. & O'BRIEN, E.A. (2001). The MEROPS database as a protease information system. *J. Struct. Biol.* 134: 95-102.
- BARRETT, A.J., TOLLE, D.P. & RAWLINGS, N.D. (2003). Managing peptidases in the genomic era. *Biol. Chem.* 384: 873-882.
- BENDEL, C. M., HOSTETTER, M. K. 1993. Distinct mechanisms of epithelial adhesion for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J. Clin. Investig.* 92, 1840-1849.
- BENNETT, J. E.; IZUMIKAWA, K. & MARR, K. A. (2004). Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(5): 1773-7.
- BERKTIÉ, J., LELL, C.P., FUCHS, A., STOIBER, H., SPETH, C., LASS-FLORL, C., BORG-VON ZEPELIN, M., DIERICH, M.P. & WURZNER, R. (2001). HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 31: 65-71.
- BHADAURIA, V.; POPESCU, L.; ZHAO, W. S. & PENG, Y. L. (2007). Fungal transcriptomics. *Microbiol. Res.* 162(4): 285-98.
- BHALLY, H. S.; SHIELDS, C.; LIN, S. Y. & MERZ, W. G. (2004). Otitis caused by *Scedosporium apiospermum* in an immunocompetent child. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 68: 975-978.
- BITTENCOURT, V.C.B.; FIGUEIREDO, R.T.; SILVA, R.B.; MOURÃO-SÁ, D.S.; FERNANDEZ, P.L.; SASSAKI, G.L.; MULLOY, B.; BOZZA, M.T. & BARRETO-BERGTER, E. (2006). An α -glucan of *Pseudallescheria boydii* Is involved in fungal phagocytosis and Toll-like receptor activations. *J. Biol. Chem.* 281: 22614-22623.
- BLASI, E., COLOMBARI, B., ORSI, C.F., PINTI, M., TROIANO, L., COSSARIZZA, A., ESPOSITO, R., PEPPOLONI, S., MUSSINI, C., NEGLIA, R. (2004). The human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitor indinavir directly affects the opportunistic fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 42: 187-195.
- BODDI, S.; COMPARINI, C.; CALAMASSI, R.; PAZZAGLI, L.; CAPPUGI, G. & SCALA, A. (2004). Cerato-platanin protein is located in the cell walls of ascospores, conidia and hyphae of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. platani. *FEMS Microbiol. Lett.* 233(2): 341-6.
- BODE, W. & HUBER, R. 1991. Ligand binding: proteinase-protein inhibitors interactions. *Curr. Opin. Biol.*, 1, 45-52.
- BODE, W. & HUBER, R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction whit proteinases. *Eur. J. Biochem.*, 204, 433-451.
- BONAMIGO, R R; AULER, A.; DURO, K. M. & CARTELL, A. (2007). *Scedosporium apiospermum* infection and treatment with Voriconazole. *An. Bras. Dermatol.* 82(6): 572-4.
- BOND, J.S. & BUTLER, P.E. (1987). Intracellular proteases. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 333-364.
- BOSMAN, F. T., STAMENKOVIC, I. 2003. Functional struture and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.*, 200, 423-428.

- BOUCHARA, J. P., SANCHEZ, M., CHEVAILLER, A., MAROT-LEBLOND, A., LISSITZKY, J. C., TRONCHIN, G., CHABASSE, D. 1997. Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.*, 65, 2717-2724.
- BOUWS, H.; WATTENBERG, A. & ZORN H. (2008). Fungal secretomes—nature’s toolbox for white biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 381–388.
- BROWN, G.D.; HERRE, J.; WILLIAMS, D.L.; WILLMENT, J.A.; MARSHALL, A.S. & GORDON, S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J. Exp. Med.* 197: 1119-1124.
- BUROKER-KILGORE, M. AND WANG, K. K W. (1993). A Coomassie brilliant blue G-250-based colorimetric assay for measuring activity of calpain and other proteases. *Anal. Biochem.*, 208: 387-392.
- BUTLER, H. M.; HURSE, A.; THURSKY, E. AND SHULMAN A. (1969). Bactericidal action of selected phenanthroline chelates and related compounds. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 47(5): 541-52.
- BUZINA, W.; FEIERL, G.; HAAS, D.; REINTHALER, F. F.; HOLL, A.; KLEINERT, R.; REICHENPFADER, B.; ROLL, P. & MARTH, E. (2006). Lethal brain abscess due to the fungus *Scedosporium apiospermum* (teleomorph *Pseudallescheria boydii*) after a near-drowning incident: case report and review of the literature. *Med Mycol.* 44(5): 473-7
- CABIB, E., DRGON, T., DRGONOVÁ, J., FORD, R., A., KÓLLAR, R. 1997. The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 200-204.
- CABIB, E.; BOWERS, B.; SBURLATI, A. & SILVERMAN, S.J. (1988). Fungal cell wall synthesis the construction of a biological structure. *Microbiol. Sci.* 5: 370-375.
- CAMPOS, E. G.; JESUINO, R. S.; DANTAS ADA, S.; BRÍGIDO, M. M. & FELIPE, M. S. (2005). Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genet. Mol. Res.* 4(2): 409-29.
- CARBERRY, S. & DOYLE, S. (2007). Proteomic studies in biomedically and industrially relevant fungi. *Cytotechnology.* 53(1-3): 95-100.
- CARPENTER, S. & O’NEILL, L.A. (2007). How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cell. Microbiol.* 9: 1891-1901.
- CASADEVALL, A. & PIROFSKI, L. A. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* 67(8): 3703-13.
- CASOLARI, C., ROSSI, T., BAGGIO, G., COPPI, A., ZANDOMENEGUI, G. RUBERTO, A.I., FARINA, C., FABIO, G., ZANCA, A. & CASTELLI, M. (2004). Interaction between saquinavir and antimycotic drugs on *C. albicans* and *C. neoformans* strains. *Pharmacol. Res.* 50: 605-610.
- CAZZULO, J.J., STOKA, V. & TURK, V. (2002). The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chaga’s disease. *Curr. Pharm. Des.* 7: 1143-1156.
- CHANG K. P. AND FONG D. (1982). Antigenic changes during intracellular differentiation of *Leishmania mexicana* in cultured macrophages. *Infect. Immun.*, 36(1): 430-431.
- CHAVEIRO, M.A.; VIEIRA, R.; CARDOSO, J.; AFONSO, A. (2003). Cutaneous infection due to *Scedosporium apiospermum* in an immunosuppressed patient. *J EADV* 17: 47-49.

- CORTEZ, K.J., ROILIDES, E., QUIROZ-TELLES, F., MELETIADIS, J., ANTACHOPOULOS, C., KNUDSEN, T., BUCHANAN, W., MILANOVICH, J., SUTTON, D.A., FOTHERGILL, A., RINALDI, M.G., SHEA, Y.R., ZAOUITIS, T., KOTILIL, S. & WALSH TJ. (2008). Infections caused by *Scedosporium* spp. Clin. Microbiol. Rev. 21: 157-197.
- COSTA, E. M. M. B., SANTOS, A. L. S., CARDOSO, A. S., PORTELA, M. B., ABREU, C. M., ALVIANO, C. S., HAGLER, A. N., SOARES, R. M. A. 2003. Heterogeneity of metallo and serine extracellular proteinases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. FEMS Immun. Med. Microbiol., 38, 173-180.
- COYLE B.; KAVANAGH, K.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M. AND GERAGHTY, M. (2003). Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes. BioMetals, 16: 321-329.
- CRAIK, M. & DEBOUCK, C. (1995). In: Perspectives in drug discovery and design. MCKERROW, J.H. and JAMES, M.N.G., eds., ESCOM, Leiden, 2: 1-125.
- CUE, D.; DOMBEK, P. E.; LAM, H. & CLEARY, P. P. (1998). *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. Infect. Immun. 66(10): 4593-601
- CUTLER, J.E. (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. Annu. Rev. Microbiol. 45: 187-218.
- DARKE, P. & HUFF, J. (1994). HIV protease as an inhibitor target for the treatment of AIDS. Adv. Pharmacol. 25: 399-454.
- DASH, C.; KULKARNI, A., DUNN, B & RAO, M. (2003). Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. Clin. Rev. Biochem. Mol. Biol. 38: 89-119.
- DE BERNARDIS, F., SULLIVAN, P.A. & CASSONE, A. (2001). Aspartyl proteinase of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. Med. Mycol. 39: 303-313.
- DE HOOG, G. S., GUARRO, J.; GENE, J. & FIGUERAS, M. J. (2000). Atlas of clinical fungi. 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
- DE MELO, A. C.; DORNELAS-RIBEIRO, M.; DE SOUZA, E. .P; MACRAE, A.; FRACALANZZA, S. E. & VERMELHO, A. B. (2007). Peptidase profiles from non-albicans *Candida* spp. isolated from the blood of a patient with chronic myeloid leukemia and another with sickle cell disease. FEMS Yeast Res. 7(6): 1004-12
- DE VIZCAYA-RUIZ, A., RIVERRO-MULLER, A., RUIZ-RAMIREZ, L., KASS, G.N., KELLAND, L.R., ORR, R.M. & DOBROTA, M. (2000). Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compoud, casiopenia II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. Toxicol. In vitro 14: 1-5.
- DESHPANDE, N.; WILKINS, M. R.; PACKER, N. & NEVALAINEN, H. (2008). Protein glycosylation pathways in filamentous fungi. Glycobiology. 18(8): 626-37.
- DICKMANN, M. B. & YARDEN, O. (2000). Serine/Threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. Fungal Genet. Biol. 26: 99-117.
- DINADAYALA, P.; LEMASSU, A.; GRANOVSKI, P.; CÉRANTOLA, S.; WINTER, N. & DAFFÉ, M. (2004). Revisiting the structure of the anti-neoplastic glucans of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin.

- Structural analysis of the extracellular and boiling water extract-derived glucans of the vaccine substrains. *J. Biol. Chem.* 279: 12369-12378.
- DUBREUIL J. D.; GIUDICE G. D. AND RAPPUOLI R. (2002). *Helicobacter pylori* interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66(4): 617-629.
- EIGENHEER, R.A., JIN LEE, Y., BLUMWALD, E., PHINNEY, B.S., GELLI, A. (2007). Extracellular glycosylphosphatidylinositol-anchored mannoproteins and proteases of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 7: 499-510.
- ESHWIKA A.; COYLE B.; DEVEREUX M.; MCCANN M. AND KAVANAGH K. (2004). Metal complexes of 1,10-phenanthroline-5,6-dione alter the susceptibility of the yeast *Candida albicans* to amphotericin B and miconazole. *Biomaterials*. 17(4): 415-422.
- FATH, M., WU, X., HILEMAN, R., LINHARDT, R., KASHEM, M., NELSON, R., WRIGTH, C. & ABRAHAM, W. (1998). Interaction of secretory leukocyte protease inhibitor with heparin inhibits proteases evolved in asthma. *J. Biol. Chem.* 273: 13563-13569.
- FEAR, G., KOMARNYTSKY, S. & RASKIN, I. (2007). Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. *Pharmacol. Ther.* 113: 354-368.
- FELK, A.; KRETSCHMAR, M.; ALBRECHT, A.; SCHALLER, M.; BEINHAEUER, S.; NICHTERLEIN, T.; SANGLARD, D.; KORTING, H. C.; SCHÄFER, W. & HUBE, B. (2002). *Candida albicans* hyphal formation and expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect. Immun.* 70: 3689-3600.
- FENELON, G. (1999). Tremor. Diagnostic orientation. *Rev. Prat.* 49: 1435-1439.
- FISHER, F. & COOK, N. B. (1998). Fundamentals of diagnostic mycology. W. B. Saunders Company, pp. 179-181.
- FONSECA, C.A., JESUINO, R.S., FELIPE, M.S., CUNHA, D.A., BRITO, W.A., SOARES, C.M. (2001). Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microb. Infect.* 3: 535-342.
- FONTAINE, T.; SIMENEL, C.; DUBREUCQ, G.; ADAM, O.; DELEPIERRE, M.; LEMOINE, J. VORGAS, C. E.; DIAQUIN, M. & LATGE, J. P. (2000). Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. Biol. Chem.* 275 (36) 27594-27607.
- FRAZEN, A.J.; SOUZA, W.; FARINA, M.; ALVIANO, C.S. & ROZENTAL, S. (1999). Morphometric and densitometric study of the biogenesis of electron-dense granules in *Fonsecaea pedrosoi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 173: 395-402.
- GANENDREN, R., CARTER, E., SORRELL, T., WIDMER, F., WRIGHT, L. (2006). Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microb. Infect.* 8: 1006-15.
- GARCÍA, J.; PERKINS, A.; GARAU, M.; GENÉ, J.; MOLINA, L. & PALACIO, A. (2003). Tratamiento eficaz con voriconazol de un fungoma pulmonar por *Pseudallescheria boydii* em um paciente com infección por VIH y tuberculosis previa. *Rev. Iberoam. Micol.* 20: 64-67.

- GAUR, N. K.; KLOTZ, S. A. & HENDERSON, R. L. (1999). Overexpression of the *Candida albicans* ALA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in aggregation following attachment of yeast cells to extracellular matrix proteins, adherence properties similar to those of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 67(11): 6040-7.
- GEHRT, A.; PETER, J.; PIZZO, P. A. & WALSH, T. J. (1995). Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by broth microdilution method. *J. Clin. Microbiol.* 33(5): 1302-7.
- GERAGHTY, M.; CRONIN, J. F., DEVEREUX, M. AND MCCANN, M. (2000). Synthesis and antimicrobial activity of copper(II) and manganese(II) α,ω -dicarboxylate complexes. *BioMetals*, 13: 1-8.
- GHANNOUM M. A. AND ABU-ELTEEN K. H. (1990). Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses*. 33(6): 265-282.
- GIBSON, W. & HALL, M. (1997). Assemblin, an essential herpesvirus proteinase. *Drug Discov.* 15:39-47.
- GIL M. L.; CASANOVA M. AND MARTINEZ J. P. (1994). Changes in the cell wall glycoprotein composition of *Candida albicans* associated to the inhibition of germ tube formation by EDTA. *Arch. Microbiol.*, 161(6): 489-494.
- GILGADO, F.; GENE, J.; CANO, J. & GUARRO, J. (2009). Heterothallism in *Scedosporium apiospermum* and description of its teleomorph *Pseudallescheria apiosperma* sp. nov. *Med. Mycol.* 5: 1-7
- GILGADO, F.; SERENA, C.; CANO, J.; GENÉ, J. & GUARRO, J. (2006). Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(12): 4211-3.
- GIL-LAMAGNIERE, C.; ROILIDES, E.; LYMAN, C.A.; SIMITSOPOULOU, M.; STERGIOPOULOU, T.; MALOUKOU, A. & WALSH, T.J. (2003). Human phagocytic cell responses to *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*): variable susceptibility to oxidative injury. *Infect. Immun.* 71: 6472-6478.
- GINTER G.; PETUTSCHNIG B.; PIERER G.; SOYER H. P.; REISCHLE S.; KERN T. AND DE HOOG S. (1999). Case report. Atypical cutaneous pseudallescheriosis refractory to antifungal agents. *Mycoses*, 42: 507-511.
- GONÇALVES, A.M.; NEHME, N.S. & MOREL, C.M. (1984). *In: Genes, Antigens and Parasites*. Carlos Morel (ed.), Rio de Janeiro, R.J., 106-107.
- GONZÁLES, A.; GÓMEZ, B. L.; DIEZ, S.; HERNÁNDEZ, O.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A. J. & CANO, L. E. (2005). Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. *Infect. Immun.* 73: 2486-2495.
- GONZÁLEZ, A.; GÓMEZ, B. L.; MUÑOZ, C.; ARISTIZABAL, B. H.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A. J. & CANO, L. E. (2008a). Involvement of extracellular matrix proteins in the course of experimental paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol. Méd. Microbiol.* 53(1): 114-25.
- GONZÁLEZ, A.; LENZI, H. L.; MOTTA, E. M.; CAPUTO, L.; RESTREPO, A. & CANO, L. E. (2008b). Expression and arrangement of extracellular matrix proteins in the lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Int. J. Exp. Pathol.* 89(2): 106-16.

- GONZÁLEZ, G.M., TIJERINA, R., NAJVAR, L.K., BOCANEGRA, R., RINALDI, M.G., LOEBENBERG, D., GRAYBILL, J.R. (2003). Activity of posaconazole against *Pseudallescheria boydii*: in vitro and in vivo assays. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1436-1438.
- GRUBER, A., SPETH, C., LUKASSER-VOGL, E., ZANGERLE, R., BORG-VON ZEPELIN, M., DIERICH, M.P. & WÜRZNER, R. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor attenuates *Candida albicans* virulence properties in vitro. *Immunopharmacol.* 41: 227-234.
- GUARRO, J.; KANTARCIOGLU, A. S.; HORRÉ, R.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA ESTRELLA, M.; BERENQUER, J. & DE HOOG, G. S. (2006). *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med. Mycol.* 44(4): 295-327.
- HAMILTON, A. J., JEAUVONS, L., YOUNGCHIM, S., VANITTANAKOM, N. 1999. Recognition of fibronectin by *Penicillium marneffei* conidia via a sialic acid-dependent process and its relationship to the interaction between conidia and laminin. *Infect. Immun.*, 67, 5200-5205.
- HAYNES, K. (2001). Virulence in *Candida* species. *TRENDS in Microbiol.* 9(12):
- HO, D.D., NEUMAN, A.V., PERELSON, A.S., CHEN, W., LEONARD, J.M., MARKOWITZ, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD-4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373: 123-126.
- HOGAN, L.H.; KLEIN, B.S. & LEVITZ, S.M. (1996). Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 469-488.
- HOHL, T.M.; van EPPS, H.L.; RIVERA, A.; MORGAN L.A.; CHEN, P.L.; FELDMESSER, M. & PAMER, E.G. (2005). *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathog.* 3: e30.
- HONG, L., TURNER, R.T., KOELSCH, G., SHIN, D., GHOSH, A. K. & TANG, J. (2002). Crystal structure of memapsin 2 (β -secretase) in complex with an inhibitor OM00-3. *Biochem.* 41: 10963-10967.
- HOOPER, N.M. (2002). Proteases: a primer. *Essays in Biochem.* 38: 1-8
- HOOVER, D., LEFKER, B., ROSATI, R., WESTER, R., KLEINMAN, E., BINDRA, J., HOLT, W., MURPHY, W., MANGIAPANE, M., HOCKEL, G.M. (1995). Discovery of inhibitors of human rennin with high oral bioavailability. *Adv. Exp. Med. Biol.* 362: 167-180.
- HORTON, J. D. & SHIMOMURA, I. (1999). Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr. Opin. Lipidol.* 10(2): 143-50.
- HORTON, J. D. (2002). Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 30(6): 1091-5.
- HUBE B. (2000). Extracellular proteinases of human pathogenic fungi. *Contrib. Microbiol.* 5: 126-37.
- HUGHES, A. L.; TODD, B. L. & ESPENSHADE, P. J. (2005). SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell.* 120(6): 831-42.
- HUNG, C.Y., SESHAN, K.R., YU, J.J., SCHALLER, R., XUE, J., BASRUR, V., GARDNER, M.J. & COLE, G.T. (2005). A metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* contributes to evasion of host detection. *Infect. Immun.* 73: 6689-703.

- IWAMOTO, K.; KAWANOBE, H.; IKAWA, T. & SHIRAIWA, Y. (2003). Characterization of Salt-Regulated Mannitol-1-Phosphate Dehydrogenase in the Red Alga *Caloglossa continua*. *Plant. Physiol.* 133: 893-900
- KALTSEIS, J.; RAINER, J. & DE HOOG, G. S. (2009). Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med. Mycol.* 47(4): 398-405.
- KANAFANI, Z. A.; COMAIR, Y. & KANJ, S. S. (2004). *Pseudallescheria boydii* cranial osteomyelitis and subdural empyema successfully treated with voriconazole: a case report and literature review. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 23: 836-840.
- KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M. & KOZIK, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta. Biochimica. Polonica.* 56: 211-224.
- KEDZIERSKA, A.; KOCHAN, P.; PIETRZYK, A. & KEDZIERSKA J. (2007). Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnosics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1-3)beta-D-glucan antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 755-766.
- KIFFER-MOREIRA, T., PINHEIRO, A.A., PINTO, M.R., ESTEVES, F.F., SOUTO-PADRÓN, T., BARRETO-BERGTER, E., MEYER-FERNANDES, J.R. (2007). Mycelial forms of *Pseudallescheria boydii* present ectophosphatase activities. *Arch. Microbiol.* 188: 159-66.
- KIM, Y.; NANDAKUMAR, M. P. & MARTEN, M. R. (2007). Proteomics of filamentous fungi. *Trends Biotechnol.* 25(9): 395-400.
- KLEINERT, H., STEIN, H., BOYD, S., FUNG, A., BAKER, W., VERBURG, K., POLAKOWSKI, J., KOVAR, P., BARLOW, J. & COHEN, J. (1992). Discovery of a well-absorbed, efficacious rennin inhibitor, a-74273. *Hypertension* 20: 768-775.
- KLOTZ, S. A., SMITH, R. L. 1991. A Fn receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. *J. Infect. Dis.* 163, 604-610.
- KNEIPP, L. F.; RODRIGUES, M. L.; HOLIDINO, C.; ESTEVES, F. F.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R. & MEYER-FERNANDES, J. R. (2004). Ectophosphatase activity in conidial forms of *Fonsecaea pedrosoi* is modulated by exogenous phosphate and influences fungal adhesion to mammalian cells. *Microbiology.* 150(10): 3355-62.
- KORTING, H., SCHALLER, M., EDER, G., HAMM, G., BÖHMER, U., HUBE, B. (1999). Effects of human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on "in vitro" activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2038-2042.
- KWON-CHUNG, K.S. & BENNET, J.E. (1996). Pseudallescheriosis. *In: Medical Mycology*, Lea & Febiger, EUA, pp. 678-694.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage Ta. *Nature* 227: 680-685.

- LANE, J. E.; BOGITSH, B. J.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; KRAL, M.; JONES, M. M. AND CARTER, C. E. (1998). Ultrastructural effects of the chelating agent 1,10-phenanthroline on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in vitro. *Parasitol Res.*, 84(5): 399-402.
- LARCHER, G.; BOUCHARA, J. P.; ANNAIX, V.; SYMOENS, F.; CHABASSE, D. & TRONCHIN, G. (1992). Purification and characterization of a fibrinogenolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate. *FEBS Lett.* 308(1): 65-9
- LARCHER, G.; CIMON, B.; SYMOENS, F.; TRONCHIN, G.; CHABASSE, D. & BOUCHARA, J.P. (1996). A 33 kDa serine peptidase from *Scedosporium apiospermum*. *Biochem. J.* 315: 119-126.
- LEE, J.D. & KOLATTUKUDY, P.E. (1995). Molecular cloning of the cDNA and gene for an elastinolytic aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus* and evidence of its secretion by the fungus during invasion of the host lung. *Infect Immun.* 63: 3796-803.
- LEUNG, D., ABBENANTE, G. & FAIRLIE, D.P. (2000). Protease inhibitors: current status and future prospects. *J. Med. Chem.* 43: 305-341.
- LEY, K. (2002). Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol. Rev.* 186: 8-18.
- LIMA, O. C.; BOUCHARA, J. P.; RENIER, G.; MAROT-LEBLOND, A.; CHABASSE, D. & LOPES-BEZERRA, L. M. (2004). Immunofluorescence and flow cytometry analysis of fibronectin and laminin binding to *Sporothrix schenckii* yeast cells and conidia. *Microb. Pathog.* 37(3): 131-40.
- LIMA, O. C.; FIGUEIREDO, C. C.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; MORANDI, V. & LOPES BEZERRA, L. M. (2001) Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infect. Immun.* 69(11): 6874-80.
- LLOYD, D. H.; VIAC, J.; WERLING, D.; RÈME, C. A. & GATTO, H. (2007). Role of sugars in surface microbe-host interactions and immune reaction modulation. *Vet. Dermatol.* 18(4): 197-204.
- LOPES, J. O.; ALVES, S. H.; BENEVENGA, J. P.; SALLA, A.; KHMOHAN, C. AND SILVA, C. B. (1994). Subcutaneous pseudallescheriasis in a renal transplant recipient. *Mycopathologia.* 125: 153-156.
- LOWRY, O.H.; REBROUGH, N.J.; FAN, A.L. & RANDAL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- LUSTIGMAN, S.; BROTMAN, B.; HUMA, T.; PRINCE, A. M. & MCKERROW, J. H. (1992). Molecular cloning and characterization of onchocystatin, a cystein proteinase inhibitor of *Onchocerca volvulus*. *J. Biol. Chem.* 267: 17339-17346.
- MARR K. A. (2008). Fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Med. Mycol.* 46(4): 293-302.
- MARTINEZ, L. R. & CASADEVALL A. (2006). *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. *Infect Immun.* 74(11): 6118-23.
- MATA-ESSAYAG, S., MAGALDI, S., HARTUNG DE CAPRILES, C., DEIBIS, L., VERDE, G. & PEREZ, C. (2000). "In vitro" antifungal activity of protease inhibitors. *Mycopathology* 152: 135-142.

- MATTHEWS, R. C. & BURNIE, J. P. (2004). Recombinant antibodies: a natural partner in combinatorial antifungal therapy. *Vaccine* 22: 865–871.
- MCCANN, M.; COYLE, B.; MCKAY, S.; MCCORMACK, P.; KAVANAGH, K.; DEVEREUX, M.; MCKEE, V.; KINSELLA, P.; O'CONNOR, R. & CLYNES, M. (2004). Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag(phendio)₂]ClO₄ (phendio = 1,10-phenanthroline-5,6-dione) and its effects on fungal and mammalian cells. *BioMetals* 17: 635–645.
- MCCANN, M.; GERAGHTY, M.; DEVEREUX, M.; O'SHEA, D.; MASON, J. & O'SULLIVAN, L. (2002). Insights into the mode of action of the anti-Candida activity of 1,10-phenanthroline and its metal chelates. *Metal-Based Drugs* 7: 185–193.
- MCDONALD, J.K. (1985). An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. *Histochemistry* 17: 773-785.
- MCKERROW, J.H. (1989). Parasite proteases. *Exp. Parasitol.* 68: 111-115.
- MCMAHON, J. P.; WHEAT, J.; SOBEL, M. E.; PASULA, R.; DOWNING, J. F. & MARTIN, W. J. (1995). Murine laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. *J Clin Invest.* 96(2): 1010-7.
- MEDINA, M. L.; KIERNAN, U. A. & FRANCISCO, W. A. (2004). Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Fungal Genet. Biol.* 41(3): 327-35
- MEIRA, D.D.; MARINHO-CARVALHO, M. M.; TEIXEIRA, C. A.; VEIGA, V. F.; DA POIAN, A. T.; HOLANDINO, C.; DE FREITAS, M. S. & SOLA-PENNA M (2005). Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes. *Mol. Genet. Metab.* 84: 354-362
- MELETIADIS, J., MEIS, J.F., MOUTON, J.W., RODRIQUEZ-TUDELA, J.L., DONNELLY, J.P., VERWEIJ, P.E, & EUROFUNG NETWORK. (2002). In vitro activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 62-8.
- MENDES-GIANNINI, M. J. S.; ANDREOTTI, P. F.; VICENZI, L. R.; DA SILVA, J. L. M.; LENZI, L. H.; BENARD, G.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; GUEDES, L. M. & SOARES, C. P. (2006). Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes. Infect.* 8: 1550–1559.
- MILLER M. A.; GREENBERGER P. A.; AMERIAN R.; TOOGOOD J. H.; NOSKIN G. A.; ROBERTS M. AND PATTERSON R. (1993). Allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Pseudallescheria boydii*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 148(3): 810-812.
- MIYAZAKI, T.; KOHNO, S.; MITSUTAKE, K.; MAESAKI, S.; TANAKA, J.; ISHIKAWA, N. & HARA, K. (1995). Plasma (1-3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3115-3118.
- MIYOSHI, S. & SHINODA, S. (2000). Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microb. Infect.* 2: 91–98.
- MONARI, C., PERICOLINI, E., BISTONI, G., CENCI, E., BISTONI, F. & VECCHIARELLI, A. (2005). Influence of indinavir on virulence and growth of *Cryptococcus neoformans*. *J. Infect. Dis.* 191: 307-311.
- MONOD, M. (2008). Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia* 166: 285-94.

- MONOD, M.; CAPOCCIA, S.; LECHENNE, B.; ZAUGG, C.; HOLDOM, M. & JOUSSON, O. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 405-419.
- MONTEJO, M.; MUÑIZ, M. L.; ZÁRRAGA, S.; AGUIRREBENGOA, K.; AMENABAR, J. J.; LÓPEZ-SORIA, L. & GONZALEZ, R. (2002). Case reports. Infection due to *Scedosporium apiospermum* in renal transplant recipients: a report of two cases and literature review of central nervous system and cutaneous infections by *Pseudallescheria boydii*/ *Sc. apiospermum*. *Mycoses* 45: 418-427.
- MORGENSTERN, D.E.; GIFFORD, M.A.; LI, L.L.; DOERSCHUNK, C.M. & DINAUER, M.C. (1997). Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J. Exp. Med.* 18: 207-218.
- MUELLER, G. M. & SCHMIT J. P. (2006). Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation.* 16: 1-5.
- MUNRO, C.A., HUBE, B. (2002). Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. *Trends Microbiol.* 4:173-177.
- NAGLIK JR, CHALLACOMBE SJ & HUBE B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 400-428.
- NESKY M. A.; MCDUGAL E. C. & PEACOCK J. E. (2000). *Pseudallescheria boydii* brain abscess successfully treated with voriconazole and surgical drainage: case report and literature review of central nervous system pseudallescheriasis. *Clin. Infect. Dis.* 31: 673-677.
- NEYNDORFF, H. C.; BARTEL, D. L.; TUFARO, F. & LEVY, J. G. (1990). Development of a model to demonstrate photosensitizer-mediated viral inactivation in blood. *Transfusion.* 30(6): 485-90
- NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M.L.; RODRIGUES, E.G; & TRAVASSOS, L.R. (2005). The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microb. Infect.* 7: 789-798.
- NONAKA, D., YFANTIS, H., SOUTHALL, P., SUN, C. 2002. Pseudallescheriasis as an aggressive opportunistic infection in a bone marrow transplant recipient. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 126, 207-209.
- NOSANCHUK, J. D.; STEENBERGEN, J. N; SHI, L.; DEEPE JR., G. S & CASADEVALL, A. (2003). Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *J. Clin. Invest.* 112: 1164-1175.
- NOSANCHUK, J.D. & CASADEVALL, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 5: 203-223.
- NUCCI M. (2003). Emerging moulds: *Fusarium*, *Scedosporium* and Zygomycetes in transplant recipients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16(6): 607-12.
- O'BRYAN, T. A.; BROWNE, F. A. & SCHONDER, J. F. (2002). *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*) endocarditis. *J. Infect.* 44: 189-192.
- O'BRYAN, T.A. (2005). Pseudallescheriasis in the 21st century. *Exp. Rev. Anti. Infect. Ther.* 3: 765-73.
- ODA, K., KAKIZONO, D., YAMADA, O., IEFUJI, H., AKITA, O. & IWASHITA, K. (2006). Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3448-3457.

- ODA, K.; KAKIZONO, D.; YAMADA, O.; IEFUJI, H.; AKITA, O. & IWASHITA, K. (2006). Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(5): 3448-57
- PALMEIRA, V.F., KNEIPP, L.F., ALVIANO, C.S. & SANTOS, A.L.S. (2006) The major chromoblastomycosis fungal pathogen *Fonsecaea pedrosoi* extracellularly releases proteolytic enzymes whose expression is modulated by culture medium composition: implications on the fungal development and cleavage of key's host structures. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46: 21-29.
- PALMEIRA, V.F., KNEIPP, L.F., ALVIANO, C.S. & SANTOS, A.L.S. (2006b). Secretory aspartyl peptidase from mycelia of *Fonsecaea pedrosoi*: effect of HIV peptidase inhibitors. *Res. Microbiol.* 157: 819-826
- PALMEIRA, V.F., KNEIPP, L.F., ROZENTAL, S., ALVIANO, C.S. & SANTOS, A.L. (2008). Beneficial effects of HIV peptidase inhibitors on *Fonsecaea pedrosoi*: promising compounds to arrest key fungal biological processes and virulence. *PLoS ONE* 3: e3382.
- PANKOV, R. & YAMADA, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *J. Cell. Sci.* 115(20): 3861-3.
- PAPER, J. M.; SCOTT-CRAIG, J. S.; ADHIKARI, N. D.; CUOMO, C. A. & WALTON, J. D. (2007). Comparative proteomics of extracellular proteins in vitro and in planta from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Proteomics.* 7(17): 3171-83.
- PEÑALVER, M., O'CONNOR, J. E., MARTINEZ, J. P., GIL, M. L. 1996. Binding of human fibronectin to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* 64, 1146-1153.
- PENN C. AND KLOTZ S. A. (1994). Binding of plasma fibronectin to *Candida albicans* occurs through the cell binding domain. *Microb. Pathog.*, 17(6): 387-393.
- PEREIRA, L.A., BÁO, S.N., BARBOSA, M.S., DA SILVA, J.L., FELIPE, M.S., DE SANTANA, J.M., MENDES-GIANNINI, M.J., DE ALMEIDA SOARES, C.M. (2007). Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res.* 7: 1381-1388.
- PEREIRA, M.M.; SILVA, B.A.; PINTO, M.R.; BARRETO-BERGTER, E. & SANTOS, A.L.S. (2009). Proteins and peptidases from conidia and mycelia of *Scedosporium apiospermum* strain HLPB. *Mycopathologia* 167: 25-30.
- PIHET, M.; CARRERE, J.; CIMON, B.; CHABASSE, D.; DELHAES, L.; SYMOENS, F. & BOUCHARA, J. P. (2009). Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. *Med. Mycol.* 47(4): 387-97
- PINTI, M., ORSI, C.F., GIBELLINI, L., ESPOSITO, R., COSSARIZZA, A., BLASI, E., PEPPOLONI, S., MUSSINI, C. (2007). Identification and characterization of an aspartyl protease from *Cryptococcus neoformans*. *FEBS Lett.* 581: 3882-3886.
- PINTO, M.R.; GORIN, P.A.J.; WAIT, R.; MULLOY, B. & BARRETO-BERGTER, E. (2005). Structures of the O-linked oligosaccharides of a complex glycoconjugate from *Pseudallescheria boydii*. *Glycobiology* 15:895-904.
- PINTO, M.R.; LIMONGI, C.L.; ROZENTAL, S.; SANTOS, A.L.S. & BARRETO-BERGTER E. (2004). Involvement of peptidorhamnomanna in the interaction of *Pseudallescheria boydii* and HEp2 cells. *Microb. Infect.* 6: 1259-1267.

- PINTO, M.R.; MULLOY, B.; HAIDO, R.M.T.; TRAVASSOS L.R. & BARRETO-BERGTER, E. (2001). A peptidorhamnomannan from the mycelium of *Pseudallescheria boydii* is a potential diagnostic antigen of this emerging human pathogen. *Microbiology*, 147: 1499-1506.
- PINTO, M.R.; RODRIGUES, M.L.; TRAVASSOS, L.R.; HAIDO, R.M.T.; WAIT, R. & BARRETO-BERGTER, E. (2002). Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. *Glycobiology* 12: 251-260.
- PONTÓN J.; RUCHEL R.; CLEMONS K. V.; COLEMAN D. C.; GRILLOT R.; GUARRO J.; ALDEBERT D.; AMBROISE-THOMAS P.; CANO J.; CARRILLO-MUNOZ A. J.; GENE J.; PINEL C.; STEVENS D. A. AND SULLIVAN D. J. (2000). Emerging pathogens. *Med. Mycol.*, 38 Suppl 1: 225-236
- PONTÓN, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev. Iberoam. Micol.* 25: 78-82.
- PORTER, S.R. & SCULLY, C. (1998). HIV topic update: protease inhibitor therapy and oral health care. *Oral Dis.* 4: 159-163.
- POTTRAZ, S. T.; PAULSRUD, J. R.; SMITH, J. S.; MARTIN, W. J. (1994). Evidence for *Pneumocystis carinii* binding to a cell-free substrate: role of the adhesive protein Fn. *J. Lab. Clin. Med.* 123: 273-281.
- POZA G.; MONTOYA J.; REDONDO C.; RUIZ J.; VILA N.; RODRIGUEZ-TUDELA J. L.; CERON A. & SIMARRO E. (2000). Meningitis caused by *Pseudallescheria boydii* treated with voriconazole. *Clin. Infect. Dis.* 30: 981-982.
- RAAD, I.; HACHEM, R.; TCHOLAKIAN, R. K. & SHERERTZ, R. (2002). Efficacy of minocycline and EDTA lock solution in preventing catheter-related bacteremia, septic phlebitis, and endocarditis in rabbits. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46: 327-332.
- RAINER, J.; DE HOOG, G.S.; WEDDE, M.; GRASER, Y.; GILGES, S. (2000). Molecular variability of *Pseudallescheria boydii*, a neurotropic opportunist. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3267-3273.
- RAO, M.B., TANKSALE, M.A., MOHINI S.G. & DESHPANDE, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 597-635.
- RAVI, S.; PIERCE, C.; WITT, C.; FLOYD L. & WORMLEY, J. (2009). Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans* Under Distinct Environmental Conditions. *Mycopathol.* 167(6): 307-14.
- RAWLINGS, N.D. & BARRETT, A.J. (2000). MEROPS: the peptidase database. *Nuc. Acids Res.* 28: 323-325.
- RAWLINGS, N.D., O'BRIEN, E. & BARRETT, A.J. (2002). MEROPS: the protease database. *Nuc. Acids Res.* 30: 343-346.
- RAWLINGS, N.D., TOLLE, D.P. & BARRETT, A.J. (2004a). MEROPS: the peptidase database. *Nuc. Acids Res.* 32: 160-164.
- RAWLINGS, N.D., TOLLE, D.P. & BARRETT AJ. (2004b). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 378: 705-716.
- RIPPON, J. W. (1988). In: *Medical Mycology - The patogenic fungi and pathogenic actinomycetes*. W. B. Saunders Company (ed). pp. 651-680.

- RODRIGUES M.L.; TRAVASSOS, R.L.; MIRANDA, K.R.; FRAZEN, A.J.; ROZENTAL, S.; DE SOUZA, W.; ALVIANO, C.S. & BARRETO-BERGTER, E. (2000). Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. *Infect. Immun.* 68: 7049-7060.
- RODRIGUES, M.L.; DOS REIS, F.C.G.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R. & ALVIANO, C.S. (2003). Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase. *Microb. Pathogen.* 34: 65-71.
- ROOSE J.P. & VAN NOORDEN C.J.F. (1995). Synthetic protease inhibitors: promising compounds to arrest pathobiologic processes. *J. Lab. Clin. Med.* 125: 433-441.
- ROWAN, R.; KEEFFE, J. O.; MCCANN, M.; ABU ELTEEN, K. & KAVANAGH, K. (2009). Silver(I) activates the processing of a sterol regulatory protein within *Candida albicans*. *BioMetals*. In Press.
- RUCHEL R. AND WILICHOWSKI E. (1995). Cerebral *Pseudallescheria* mycosis after near-drowning. *Mycoses.* 38: 473-475.
- RUHNKE, M. & MASCHMEYER, G. (2002). Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer - review of the literature. *Eur. J. Med. Res.* 31;7(5): 227-35.
- RUIZ-HERRERA, J.; ELORZA, M. V.; VALENTÍN, E. & SENTANDREU, R. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* 6(1): 14-29.
- SAFDAR A.; PAPADOPOULOS E. B. & YOUNG, J. W. (2002). Breakthrough *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*) brain abscess during therapy for invasive pulmonary aspergillosis following high-risk allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Scedosporiasis and recent advances in antifungal therapy.* *Transpl. Infect. Dis.* 4: 212-217.
- SANGLARD. D.; HUBE, B.; MONOD, M.; ODDS, F.C. & GOW, N.A.R. (1997). A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect. Immun.* 65: 3539-3546.
- SANTANGELO, R., ZOELLNER, H., SORRELL, T., WILSON, C., DONALD, C., DJORDJEVIC, J., SHOUNAN, Y. & WRIGHT L. (2004). Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. *Infect. Immun.* 72; 2229-2239.
- SANTOS A.L.S., BITTENCOURT V.C.B., PINTO M.R., SILVA B.A. & BARRETO-BERGTER E. (2009). Biochemical characterization of potential virulence markers in the human fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. *Med. Mycol.* 47: 375-386.
- SANTOS, A. L. S. AND SOARES, R. M. A. (2005). *Candida guilliermondii* isolated from HIV-infected human secretes a 50 kDa serine proteinase that cleaves a broad spectrum of proteinaceous substrates. *FEMS Immu. Med. Microbiol.*, 43: 13-20.
- SANTOS, M. H. B.; COSTA, A. F. E.; SANTOS, G. S., SANTOS, A. L. S. & NAGÃO, P. E. (2009). Effect of chelating agents on the growth, surface polypeptide synthesis and interaction of *Streptococcus agalactiae* with human epithelial cells. *Mol. Med. Rep.* 2: 81-84.

- SCHALLER, M., BORELLI, C., KORTING, H.C., HUBE, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 48: 365-377.
- SEVERO L. C.; LONDERO A. T.; PICON P. D.; RIZZON C. F. AND TARASCONI J. C. (1982). *Petriellidium boydii* fungus ball in a patient with active tuberculosis. *Mycopathologia*. 77(1):15-17.
- SEVERO L. C.; OLIVEIRA F. M. AND LONDERO A. T. (1997). Subcutaneous scedosporiosis. Report of two cases and review of the literature. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 39(4): 227-230.
- SEVERO, L. C., PORTO, N. S., LONDERO, A. T. 1998. Pulmonary scedosporiosis. *Rev. Ist. Med. Trop. S. Paulo*. 40, 241-243.
- SEVERO, L. C.; OLIVEIRA, F. M. & IRION, K. (2004). Respiratory tract intracavitary colonization due to *Scedosporium apiospermum*. Report of four cases. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 46: 43-46.
- SEVLEVER, D.; MANN, K. J. AND MEDOF, M. E. (2001). Differential effect of 1,10-phenanthroline on mammalian, yeast, and parasite glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288(5): 1112-1118.
- SHARON, N. & LIS, H. 1993. Carbohydrates in Cell Recognition. *Scientific American* 268: 74-81.
- SHAW, E. (1990). Cystenyl proteinases and their selective inactivation. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 63: 271-347.
- SILVA, B. A.; SOUZA-GONCALVES, A. L.; PINTO, M. R.; BERGTER, E. B.; SANTOS, A. L. S. (2009). Metallopeptidase inhibitors arrest vital biological processes in the fungal pathogen *Scedosporium apiospermum*. *Mycoses*, in press.
- SILVA, B.A.; PINTO, M. R.; SOARES, R.M.A.; BARRETO-BERGTER, E. & SANTOS, A.L.S. (2006b). *Pseudallescheria boydii* releases metallopeptidases capable of cleaving several proteinaceous compounds. *Res. Microbiol.* 157: 425-432.
- SILVA, B.A.; SANTOS A.L.S.; BARRETO-BERGTER, E.; PINTO, M.R. (2006a). Extracellular peptidase in the fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. *Curr. Microbiol.* 53: 18-22.
- SIMONEAU, B., LAVALLEE, P., ANDERSON, P.C., BAILEY, M., BANTLE, G., BERTHIAUME, S., CHABOT, C., FAZAL, G., HAMOS, T., OGILVIE, W.W., POUPART, M.A., THAVONEKHAM, B., XIN, Z., THIBEAULT, D., BOLGER, G., PANZENBECK, M., WINQUIST, R. & JUNG, G.L. (1999). Discovery of non-peptidic P2-P3 butanediamide rennin inhibitors with high oral efficacy. *Bioorg. Med. Chem.* 7: 489-508.
- SINHA, B. FRANÇOIS, P., QUE, Y. A., HUSSAIN, M., HEILMANN, C., MOREILLON, P., LEW, D., KRAUSE, K. H., PETERS, G., HERRMANN, M. 2000. Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectina-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect. Immun.*, 68, 6871-6878.
- SMITS, G.J.; KAPTEYN, J.C.; VAN DEN ENDE, H. & KLIS, F.M. (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 348-352.
- SOARES, G. C.; SILVA, B. A.; DOS SANTOS, M. H.; DA COSTA, A. F.; SANTOS, A. L. S.; MORANDI, V. & NAGAO, P. E. (2008). Metallopeptidases produced by group B Streptococcus: influence of proteolytic inhibitors on growth and on interaction with human cell lineages. *Int. J. Mol. Med.* 22(1): 119-25

- SOLA-PENNA, M.; DOS SANTOS, A. C.; ALVES, G. G.; EL-BACHA, T.; FABER-BARATA, J.; PEREIRA, M. F.; SEREJO, F. C.; DA POIAN, A. T. & SORENSON, M. (2002). A radioassay for phosphofructokinase-1 activity in cell extracts and purified enzyme. *J. Biochem. Biophys. Methods* 50:129-140, 2002
- STEFFAN, J. & MCALISTER-HENN, L. (1992). Isolation and characterization of the yeast gene encoding the MDH3 isozyme of malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 267: 24708-24715.
- SUÁREZ, M. B.; SANZ, L.; CHAMORRO, M. I.; REY, M.; GONZÁLEZ, F. J.; LLOBELL, A. & MONTE, E. (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genet. Biol.* 42(11): 924-34.
- SUDBERY, P.; GOW, N. & BERMAN, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 12(7): 317-24.
- TACCO, B.A., PARENTE, J.A., BARBOSA, M.S., BAO, S.N., GOES, T.D., PEREIRA, M., SOARES, C.M. (2009). Characterization of a secreted aspartyl protease of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 4: 1-11.
- TANAKA, R.D., CLARK, J.N., WARNE, R.L., ABRAHAM, W.M. & KATSUOKA, K. (1995). Mast cell tryptase: a new target for therapeutic intervention in asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 408-409.
- THIAGALINGAM, S.; FERNANDO, G. T.; TAN, K.; O'DONNELL, B. A.; WEEKS, K. & BRANLEY M. (2004). Orbital apex syndrome secondary to *Pseudallescheria boydii* fungal sinusitis in an immunocompetent patient. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 32: 545-547.
- TILBURG, A. U. & THOMAS M. D. (1993). Production of extracellular proteins by the fungus *Gliocladium virens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(1): 236-242.
- TODD, B. L.; STEWART, E. V.; BURG, J. S; HUGHES, A. L. & ESPENSHADE, P. J. (2006). Sterol Regulatory Element Binding Protein Is a Principal Regulator of Anaerobic Gene Expression in Fission Yeast. *Mol. Cel. Biol.* 26(7): 2817-2831.
- TOMITA, T. (2009). Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease treatment. *Exp. Rev. Neurother.* 9: 661-79.
- TRAVIS L. B.; ROBERTS G. D. AND WILSON W. R. (1985). Clinical significance of *Pseudallescheria boydii*: a review of 10 years' experience. *Mayo. Clin. Proc.:* 60(8): 531-537.
- TRINCHESE, F., FA', M., LIU, S., ZHANG, H., HIDALGO, A., SCHMIDT, S.D., YAMAGUCHI, H., YOSHII, N., MATHEWS, P.M., NIXON, R.A. & ARANCIO, O. (2008). Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 118: 2796-807.
- TRUDEL N, GARG R, MESSIER N, SUNDAR S, OUELLETTE M, TREMBLAY MJ.(2008). Intracellular survival of *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis is significantly reduced by HIV-1 protease inhibitors. *J Infect Dis.* 198: 1292-1299.
- VAN BURIK, J.A.H.; MAGEE, P.T. (2001). Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 743-772.

- VAN NIEL, G., I. PORTO-CARREIRO, S. SIMOES, AND G. RAPOSO. (2006). Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J. Biochem. (Tokyo)* 140: 13–21.
- VARKI, A.; CUMMINGS, R.; ESKO, J.; FREEZE, H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C.; HART, G. & ETZLER, M. (2008). *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2ª edição.
- VASSAR, R., BENNETT, B.D., BABU-KHAN, S., MENDIAZ, E.A., DENIS, P., TEFLOW, D.B., ROSS, S., LILE, J., JARONSINSKI, M.A., BIERE, A. L., CURRAN, E., BURGESS, T., LOUIS, J-C., COLLINS, F., TREANOR, J., ROGE, KATZENSTEIN & GERSTOFTR, G. & CITRON, M. (1999). β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286: 735-741.
- VERMELHO, A. B.; DE SIMONE, S. G.; D'AVILA-LEVY, C. M.; SANTOS, A. L. S.; MELO, A. C. N.; SILVA JR., F. P.; BON, E. P. S. & BRANQUINHA, M. H. (2007). Trypanosomatidae Peptidases: A Target for Drugs Development. *Curr. Enz. Inhibit.* 3: 19-48.
- VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; FRANCO, M.F.; DE SOUZA, W.; MORAES, J.Z.; TRAVASSOS, L.R & LOPES, J.D. (1994). Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect. Immun.* 62: 1465-1469.
- VICKERS, I., REEVES, E.P., KAVANAGH, K.A. & DOYLE, S. (2007). Isolation, activity and immunological characterisation of a secreted aspartic protease, CtsD, from *Aspergillus fumigatus*. *Protein Expr. Purif.* 53: 216-24.
- VINZANT, T. B.; ADNEY, W. S.; DECKER, S. R.; BAKER, J. O.; KINTER, M. T.; SHERMAN, N. E.; FOX, J. W. & HIMMEL, M. E. (2001). Fingerprinting *Trichoderma reesei* hydrolases in a commercial cellulase preparation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91-93: 99-107
- WARWAS, M. L.; WATSON, J. N.; BENNETT, A. J. & MOORE, M. M. (2007). Structure and role of sialic acids on the surface of *Aspergillus fumigatus* conidiospores. *Glycobiol.* 17(4): 401–410.
- WASYLNKA, J. A., MOORE, M. M. 2000. Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: Evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface. *Infect. Immun.*, 68, 3377-3384.
- WILKINS, M. R. (2002). What do we want from proteomics in the detection and avoidance of adverse drug reactions. *Toxicol. Lett.* 127(1-3): 245-9.
- WINGARD, J. R. (1999). Fungal infections after bone marrow. *Transplant. Biol. Blood. Marrow Transplant.* 5(2): 55-68.
- YANG, Y.L. (2003). Virulence factors of *Candida* species. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 36: 223–228.
- ZANG, L.H.; HOWSEMAN, A.M.& SHULMAN, R.G. (1991). Assignment of the 1H chemical shifts of glycogen. *Carbohydr. Res.* 220: 1-9.
- ZEPELIN, M. B.; MEYER, I.; THOMSEN, R.; WÜRZNER, R.; SANGLARD, D.; TELENTI, A. AND MONOD, M. (1999). HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *The journal of investigative dermatology*, 113,: 747-751.

- ZHOU, H., ZHENG, C., ZOU, G., TAO, D. & GONG, J. (2002). G1-phase specific apoptosis in liver carcinoma cell line induced by copper-1,10-phenanthroline. *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 678-684.
- ZOUHAIR, R.; DEFONTAINE, A.; OLLIVER, C.; CIMON, B.; SYMOENS, F.; HALLET, J.; DEUNFF, J. & BOUCHARA, J. (2001). Typing of *Scedosporium apiospermum* by multilocus enzyme eletrophoresis and random amplification of polymorphic DNA. *J. Med. Microbiol.* 50: 925-932.

Anexos

Alguns resultados obtidos nesta tese deram origem aos seguintes trabalhos científicos:

1. SILVA, B. A.; SOUZA-GONÇALVES, A.; PINTO, M. R.; BARRETO-BERGTER, E. & SANTOS, A. L. S. (2009). **Metallopeptidases inhibitors arrest vital biological process in the fungal pathogen *Scedosporium apiospermum***. *Myc. in press*.
2. PEREIRA, M. M.; SILVA, B. A.; PINTO, M. R.; BARRETO-BERGTER, E. & SANTOS, A. L. S. (2008). **Proteins and peptidases from conidia and mycelia of *Scedosporium apiospermum* strain HLPB**. *Mycopathol.* **167**: 25-30.
3. SANTOS, A. L. S. ; BITTENCOURT, V. C. B. ; PINTO, M. R. ; SILVA, B. A. ; BERGTER, E. B. (2009) **Biochemical characterization of potential virulence markers in the human fungal pathogen *Pseudallescheria boydii***. *Med. Mycol.* **47**: 375 - 386

Outros trabalhos científicos não relacionados à Tese de Doutorado:

4. SILVA, B. A. ; PEREIRA, F. M. ; JESUS, J. B. ; M. H. BRANQUINHA ; SANTOS, A. L. S. ; DAVILA-LEVY, C. M. (2009). **Sialoglycoconjugates in *Herpetomonas megaseliae*: role in the adhesion to insect host epithelial cells**. *FEMS Microbiology Letters.* **295**: 274-280.
5. GOMES, S. A. O. ; MISAEL, D. ; SILVA, B. A. ; FEDER, D. ; SILVA, C. S. ; GONCALVES, T. C. M. ; SANTOS, A. L. S. ; SANTOS-MALLET, J. R. (2009). **Major cysteine protease (cruzipain) in Z3 sylvatic isolates of *Trypanosoma cruzi* from Rio de Janeiro, Brazil**. *Parasitology Research, in press*.
6. PEREIRA, F. M. ; BERNARDO, P. S. ; DIAS JUNIOR, P. F. F. ; SILVA, B. A. ; ROMANOS, M. T. V. ; DAVILA-LEVY, C. M. ; M. H. Branquinha ; SANTOS, A. L. S. (2009). **Differential influence of gp63-like molecules in three distinct *Leptomonas* species on the adhesion to insect cells**. *Parasitology Research*.
7. CUERVO, P. ; SANTOS, A. L. S. ; ALVES, C. R. ; MENEZES, G. C. ; SILVA, B. A. ; BRITTO, C. ; FERNANDES, O. ; CUPOLILLO, E. ; JESUS, J. B. (2008). **Cellular localization and identification of gp63 homologous metalloproteases in *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains**. *Acta Tropica*, v. 106, p. 143-148.
8. SOARES, G. C. M. T. ; SILVA, B. A. ; SANTOS, M. H. B. ; COSTA, A. F. E. ; SANTOS, A. L. S. ; MORANDI, V. ; NAGAO, P. E. (2008). **Metallopeptidases produced by group B *Streptococcus*: influence of proteolytic inhibitors on growth and on interaction with human cell lineages**. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 22, p. 119-126.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)